ORSAY - SERIE A
N° d'ordre : 99

T H E S E
présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université

(mention Sciences)

par

Melle. Lucette PEJAUDIER

ETUDE COMPARATIVE DE QUELQUES CERULOPLASMINES ANIMALES OBTENUES A L'AIDE D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE PREPARATION

Soutenue le 29 septembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. TONNELAT	Président
CLAUSER	Rapporteur
Mme. STEINBUCH	Examinateur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551521_0029

ORSAY - SERIE A
N° d'ordre : 99

T H E S E
présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université
(mention Sciences)

par

Melle. Lucette PEJAUDIER

ETUDE COMPARATIVE DE QUELQUES CERULOPLASMINES ANIMALES OBTENUES A L'AIDE D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE PREPARATION

Soutenue le 29 septembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. TONNELAT	Président
CLAUSER	Rapporteur
Mme. STEINBUCH	Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Madame STEINBUCH, qui dirige le Laboratoire de biochimie au Centre National de TRANSFUSION SANGUINE, m'a suggéré d'entreprendre ce travail. Sa haute compétence et l'équipement de son laboratoire m'ont permis de réaliser cette étude. Je la prie de trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur CLAUSER, de la Faculté des Sciences d'Orsay, m'a éclairé de ces conseils et je désirerais lui faire savoir combien j'ai été touchée qu'il accepte ce surcroit de travail.

J'exprime aussi ma gratitude à Monsieur le Professeur TONNELAT, de la Faculté des Sciences d'Orsay, qui a accepté de présider ce Jury.

Je voudrai également dire ma reconnaissance à Mademoiselle REUGE, qui dirige le Laboratoire de Chimie au Centre National de Transfusion Sanguine, et à ses techniciennes, d'avoir eu la gentillesse de me faire profiter de leur expérience dans le domaine des dosages enzymatiques.

La compétence de Monsieur le Docteur FINE, qui dirige le Laboratoire d' Immunochimie au Centre National de Transfusion Sanguine et de ses collaborateurs m'a fortement aidée. Je les prie d'accepter mes remerciements.

J'aimerais remercier aussi Mademoiselle GROS, de la Faculté des Sciences d'Orsay, qui a eu la gentillesse de m'offrir son aide pour les problèmes de détermination des structures.

Je n'oublie pas non plus mes camarades de travail dont l'amitié ne m'a jamais fait défaut. Je tiens également à souligner que les sangs d'animaux qui constituaient la matière première de ce travail m'ont été aimablement fournis par Melle REUGE, du Centre National de Transfusion Sanguine, Monsieur le Docteur LAVERGNE

et Monsieur le Docteur LABERT, de l'Institut Pasteur de Garches, Monsieur le Docteur EYQUEM, de l'Institut Pasteur de Paris, Monsieur le Professeur HALPERN et Mademoiselle CREPIN, de l'Hopital BROUSSAIS , Monsieur le Docteur BATAGLINI, du Centre de Transfusion Sanguine de Marseille.

Enfin, les conditions de travail agréables au Centre National de Transfusion Sanguine, dirigé par Monsieur le Professeur SOULIER, m'ont permis de mener à bien ce travail.

ETUDE COMPARATIVE DE QUELQUES CERULOPLASMINES ANIMALES OBTENUES A L'AIDE D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE PREPARATION

INTRODUCTION

La céruloplasmine, du latin:caéruleus=bleu, est une α 2 globuline plasmatique qui doit son nom à sa couleur bleue intense.

Cette métalloprotéine a été isolée, en I948, par HOLMBERG et LAURELL (I) à partir de sérum de porc et de sérum humain.

La description moléculaire donnée par ces auteurs est celle d' une globuline de mobilité α2 ayant un poids moléculaire de I5I 000 et contenant 8 atomes de cuivre par molécule .

Ces chiffres sont identiques chez l'homme et chez le porc, ainsi que le point isoélectrique qui est évalué à 4,4.

Il est bien connu que le cuivre peut former des complexes colorés et notamment bleus, avec de nombreuses substances organiques; et la couleur bleue de la céruloplasmine, si étonnante pour une protéine, a été attribuée à la configuration particulière du site de fixation du cuivre dans le support protéique. De nombreuses études n'ont cependant pas permis d'élucider le problème.

L'essor des techniques de fractionnement permet l'obtention relativement aisée de protéines purifiées, et, d'une part, le fractionnement du plasma (dit "fractionnement de COHN") et d'autre part, la découverte d'une maladie congénitale chez l'homme (maladie de Wilson),caractérisée par l'absence totale ou la forte diminution de la céruloplasmine, ont suscité un grand nombre de travaux concernant cette protéine.

Ceux-ci comportent de nouvelles techniques de purification des études de structures et des recherches relatives à la signification biologique de cette cuproprotéine;

Différentes théories existent en ce qui concerne ce rôle biologique de la céruloplasmine et aucune n'est tout a fait satisfaisante dans le contexte des connaissances actuelles.

La céruloplasmine ne peut etre une protéine-transport pour le cuivre, comme la transferrine pour le fer, car le cuivre, contrairement au fer de la transferrine est solidement attaché à une structure moléculaire complexe.

-La première hypothèse envisagée était celle de rôle de régulatuer du métabolisme du cuivre, hypothèse résultant du cadre de la pathogénie de la maladie de Wilson.

En effet l'infiltration diffuse du parenchyme tissulaire par le cuivre suggérait l'absence du régulateur plasmatique de la résorption et du transport plasmatique du cuivre.

En fait, on ne sait toujours pas si l'a-(ou hypo)-céruloplasminémie est la cause ou la conséquence de cette maladie héréditaire.

La deuxième hypothèse résulte des propriétés enzymatiques de la céruloplasmine. En effet celle-ci catalyse l'oxydation des poly-amines et des poly-phénols et elle a suscité l'intérêt des psychiatres dans le contexte des pertubations métaboliques de l'adrénaline, de la sérotonine.

La céruloplasmine est, cependant, une oxydase assez faible par rapport à d'autres oxydases contenant du cuivre comme les laccases (2 ; 3) et certains auteurs (4 ; 5 ; 6) pensent que cette activité enzymatique n'est qu'une propiété accessoire et non le rôle principal de cette cuproprotéine.

- Enfin, une troisième hypothèse, plus récente, attribue à la céruloplasmine le rôle de transformer le fer ferreux en fer ferrique, d'où le nom de feroxydase, attribué à cette cuproprotéine.

Les méthodes modernes d'identification des protéines notamment celles concernant l'immunochimie, ont permis, depuis quelques années, des études comparatives de plus en plus poussées de protéines provenant de différentes espèces.

Le présent travail est une contribution à l'étude comparative des protéines plasmatiques et concerne plus particulièrement les ceruloplasmines:

du cheval
du mulet
du lapin
de la chèvre
de la brebis
du babouin.

Dans ce travail, seront successivement envisagés:
- la purification des céruloplasmines animales;
- les caractères physico-chimiques des protéines purifiées;
- l'étude comparative des propiétés enzymatiques et physico-chimiques de celles - ci.

CHAPITRE I

H I S T O R I Q U E

La plupart des techniques de purification publiées depuis la découverte de cette métalloprotéine par HOLMBERG et LAURELL (I), s'inspirent du procédé mis au point par ces auteurs.

Celui-ci comporte, en effet, une étape essentielle qui est celle de la dénaturation des protéines accompagnantes par un mélange alcool- chloroforme.

Nous allons donc décrire les opérations principales de la méthode de Holmberg et Laurell, et évoquer plus rapidement les procédés dérivant de cette première méthode.

A - TECHNIQUES D'ISOLEMENT DE LA CERULOPLASMINE HUMAINE.

I - METHODE DE HOLMBERG ET LAURELL..

I) Fractionnement du sérum humain par le sulfate d'ammonium(la fraction obtenue entre 36% et 55% de saturation est recueillie et dissoute dans l'eau et dialysée.)

2) Le PH est amené à 6,8 avec l'acide acétique dilué; le précipité jaune est écarté.

3) Le pH est ajusté à 5,5: la protéine bleue commence à précipiter.

On ajoute de l'alcool ethylique jusqu'à une concentration finale de I0%; le précipité bleu est séparé par centrifugation et dissous dans de l'eau contenant un peu de chlorure de sodium. Ce traitement repris par de nombreux auteurs, a pour but de dénaturer certaines protéines mais de laisser intacte la céruloplasmine.

4) Cette solution est traitée à pH 6,5 et à 0°C avec un volume égal d'un mélange alcool-chloroforme (9: I v/v). On laisse monter à la température ambiante et l'on élimine par centrifugation le surnageant incolore.

5) Le précipité, légèrement bleuté, est extrait par un volume égal de sérum physiologique, puis dialysé.

6) Le lendemain, nouvelle précipitation à pH 5,5 avec le même mélange alcool-chloroforme.

Seule la céruloplasmine a résisté à ce traitement; et elle est extraite à nouveau par le chlorure de sodium à 0,9 %.

La préparation peut être concentrée par addition de sulfate d'ammonium jusqu'à 65 % de saturation.

II - EMPLOI DU MELANGE ALCOOL-CHLOROFORME .

Destiné à la dénaturation des impuretés, il a été appliqué par différents auteurs aux sous-fractions obtenues au cours du fractionnement de COHN, connu sous le nom méthode 6 + 9. Ce procédé consiste en un fractionnement à l'éthanol dont les diverses étapes sont récapitulées dans le Tableau I, figurant en fin de chapitre.

I) MORELL, AISEN, SCHEINBERG. (7) 1962

Préparent la céruloplasmine à partir de la Fraction IV- I de COHN mise en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 0,4%. Ce mélange est ensuite soumis à une chromatographie sur DEAE-cellulose équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 6 et la céruloplasmine éluée avec ce même tampon contenant I% de chlorure de sodium.

Un volume d'éluat est traité par trois volumes du mélange alcool- chloroforme à la température ambiante.

Le précipité bleu est extrait par un mélange de chlorure de sodium et d'acétate de sodium de faible molarité et les protéines, insolubles, dans ces conditions sont éliminées.

L'opération de dénaturation par le mélange alcool-chloroforme est répétée, après dialyse, sur le premier extrait.

2) LE PROCEDE TRES ANALOGUE DE SGOURIS(8) I962

utilise également un extrait de la fraction IV-I de COHN avec du tampon acétate de sodium 0,I5M de pH 5,2, mais la dénaturation par le mélange alcool-chloroforme s'effectue dans des conditions plus ménageantes: la concentration finale en alcool n'étant que de 25 % et celle de chloroforme de 3%.
Les protéines dénaturées à température ambiante sont éliminées par centrifugation et la céruloplasmine est elle-même obtenue en refroidissant ce mélange de -IO °C . . L'extraction du précipité obtenu dans ces conditions donne la céruloplasmine purifiée.

3) LA TECHNIQUE DE SKVARIL et coll. (9) I965.

diffère sensiblement des deux procédés précédents car le sérum, dilué I à I avec du sérum, physiologique, est traité avec I3% de chloroforme à pH 5 avant l'obtention des Fractions II + III à partir du surnageant de la première opération .

La Fraction III, résultant du fractionnement de routine, est ensuite adsorbée sur gel d'alumine.

L' éluat obtenu avec du chlorure de sodium à 0,I5 M de pH 7,2, sert de matière première pour la préparation de la céruloplasmine. Elle est obtenue par fractionnement à l'aide de sulfate d'ammonium, suivi d'une chromatographie sur DEAE Séphadex à pH 6,8.

La céruloplasmine, reconcontrée par précipitation avec le sulfate d'ammonium, est finalement filtrée sur Séphadex G 200.

4) Nous mentionnons la technique de BJORLING (IO) I963

bien que cet auteur, ait utilisé l'acétone à la place du mélange alcool-chloroforme pour la dénaturation sélective et l'élimination de certaines impuretés.

Ce solvant est utilisé à une concentration de 33 % et à I8°C, pour l'opération de dénaturation, et la céruloplasmine est ensuite précipitée à 55% de solvant organique et à -5° C.

L'extrait obtenu est à nouveau traité dansles mêmes conditions .

La céruloplasmine brute, ainsi obtenue, est ensuite purifiée sur DEAE- cellulose ou sur DEAE Séphadex (ce dernier adsorbant paraissant supérieur).

5) CURZON et VALLET (II) I960

ont mis au point un procédé apparenté à celui de HOLMBERG et LAURELL bien que l'agent de précipitation employé soit, cette fois, l'éther et que la matière première soit la Fraction G 2 provenant du Fractionnement

à l'éther par la méthode de KERWICK et MACKAY (I2).

Après une dissociation des lipides par congélation en présence d'éther, ce dernier était à nouveau utilisé pour la précipitation de la céruloplasmine à pH 4,8 .

Un deuxième traitement, pour éliminer les impuretés, est appliqué à pH 5,35; il est suivi d'une seconde extraction de la ceruloplasmine.

Celle-ci est à nouveau précipitée à pH 4,8, fractionnée par concentration saline décroissante et, finalement purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 5,2 en présence d'un tampon acétate de sodium 0,05M.

III - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Depuis l'introduction des celluloses substituées, les procédés chromatographiques ont pris une importance croissante dans les techniques de purification de la ceruloplasmine et ils ont été appliqués, soit au plasma total, soit aux fractions résultant du fractionnement de routine.

Il est, en effet, important de souligner que la concentration normale de la céruloplasmine n'est que de 300mg par litre de plasma. L'obtention en quantités importantes de cette métalloprotéine ne peut, par suite, être réalisée qu'en utilisant comme matière première les sous-produits du fractionnement des routines.

A. TECHNIQUES UTILISANT LE PLASMA COMME PRODUIT DE DEPART.

I) BROMAN (I3)

a mis au point une telle technique dès I958 en utilisant l' hydroxylapatite comme adsorbant.

Cette technique lui a permis de décrire deux céruloplasmine de propiétés différentes.

En I964, BROMAN et KJELLIN (I4) ont amélioré cette méthode en faisant précéder la chromatographie sur hydroxylapatite d'une purification sur DEAE Séphadex suivie d'un gel- filtration su G IOO.

Procédé repris par RICHTERICH et coll. (I5) avec des résultats à peu près identiques.

2) - DEUTSCH (I6) I960

a obtenu la céruloplasmine cristallisée en soumettant le plasma humain à une chromatographie sur DEAE - cellulose en tampon acétate de sodium 0,05M de pH 5,5.

L'élution était réalisée selon la technique par gradient de BOCK et Coll (I7). Le tampon utilisé est de l'acétate de sodium 0,05 M de pH 5,5 auquel s'additionne progressivement une solution de chlorure de sodium à 0, 25 M, ce qui permet une variation continue en cours d'élution, de la molarité en chlorure de sodium de l'éluant. La céruloplasmine est largement éluée à une concentration en chlorure de sodium voisine de 0,I5 M.

Après une nouvelle concentration par le sulfate d'ammonium, la céruloplasmine est de nouveau

chromatographiée sur DEAE-cellulose à pH 7,4, et éluée selon la même méthode que précédemment, en tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 7,4 à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à 0, 25 M.

Elle est finalement concentrée et cristallisée par dialyse contre un tampon acétate de sodium de faible force ionique à pH 5,3 .

Notons que DEUTSCH et FISCHER (I8) ont effectué en I964 une dernière purification de la céruloplasmine sur hydroxylapatite selon la technique de BROMAN.

Ces auteurs ont bien obtenu deux céruloplasmines différentes, mais ils pensent qu'il s'agit d'un artéfact et que la céruloplasmine a, en fait, été dénaturée par le contact avec cet adsorbant.

B. TECHNIQUES APPLIQUEES A LA FRACTION IV-I DE COHN.

I) La première de ces techniques a été publiée par SANDERS et coll. en I959 (I9)

La Fraction IV- I de COHN est axtraite par une solution de chlorure de sodium à 0,06 M et est ensuite chromatographiée à pH 4,8 sur DEAE- cellulose équilibrée en tampon acétate de sodium 0,0I M de ph 4,8 contenant du chlorure de sodium à 0,05 M.

Si l'élution est effectuée à une concentration en chlorure de sodium de 0,I5 M on obtient un produit

de 60 à 70 % de pureté. Mais on peut obtenir une préparation à 90 % de pureté . Pour cela la DEAE-cellulose ayant adsorbé la céruloplasmine est lavée jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus protéiques et est ensuite versée sur une colonne d'une nouvelle portion de DEAE-cellulose puis soumise à une élution par gradient.

Ce procédé est éventuellement complété par une précipitation à froid à I5 % de concentration d'éthanol où certaines impuretés se révèlent plus solubles que la céruloplasmine elle-même.

2)- LE PROCEDE DE DEUTSCH,KASPER et WALSH (20) I962

est analogue mais ces auteurs travaillent à des pH différents du procédé de SANDERS et coll .

L'extrait de Fraction IV-I est d'abord chromatographié à pH 5,5 en tampon acétate de sodium 0,05M.

Après élution, la céruloplasmine est à nouveau chromatographiée sur DEAE-cellulose, toujours à pH 5,5, et elle est éluée par gradient en tampon acétate de sodium 0,05M de pH 5,5 additionné de chlorure de sodium à 0,3M.

Une troisième chromatographie, enfin, est effectuée toujours sur DEAE-cellulose, en tampon acétate de sodium 0,05M de pH 7,4 contenant du chlorure de sodium à 0,3M.

La céruloplasmine est,alors, cristallisée par dialyse.

3)STOKES (2I) I967

isole la céruloplasmine uniquement par des chromatographies sur deux colonnes échangeuses d'ions, différentes.

La Fraction IV-I de COHN est reprise dans du tampon pyrophosphate de sodium 0,02M amené à pH 7,5 à l'aide d'acide acétique.

Elle est soumise à une première adsorption sur DEAE Séphadex équilibrée contre ce même tampon. La céruloplasmine est éluée avec du chlorure de sodium à 0,25M;puis dialysée contre du tampon acétate de sodium 0,02 M de pH 5,5.

Une deuxième chromatographie est éffectuée sur CM Séphadex en tampon acétate de sodium 0,02M de pH 5,5, la céruloplasmine étant éluée en présence de tampon acétate de sodium 0,08M de pH 5,5, additionné de chlorure de sodium 0,2M.

4) Pour terminer , nous citerons la technique de STEINBUCH et QUENTIN (22) I959.

Cette méthode associe une première étape de purification à l'aide de lactate de 6,9-diamino-2- éthoxyacridine ou rivanol (+) avec une chromatographie sur DEAE-cellulose.

La solution de Fraction III obtenue au cours d'un fractionnement de routine à l'alcool est traitée par le rivanol qui, à pH 6, précipite quelques globulines.

La céruloplasmine est précipitée à partir du surnageant par une nouvelle addition de rivanol, le pH étant amené à 7,4.

Le complexe rivanol-protéine est dissous dans du tampon acétate de sodium 0,5M et les protéines, dont la céruloplasmine, sont précipitées par addition d'alcool à 50% final à pH 4: le rivanol restant dans le surnageant.

La céruloplasmine est extraite à partir de ce précipité à pH 6.

Après nouvelle concentration par précipitation alcoolique, la céruloplasmine brute est soumise à une purification par chromatographie sur DEAE - cellulose en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7.

La cérloplasmine est éluée à une molarité de 0,25 M à p H 5,7, concentrée, puis cristallisée selon la technique de DEUTSCH, par dialyse contre du tampon acétate de sodium 0,0I5 M de pH 5,3 .

B - TECHNIQUES D'ISOLEMENT DE QUELQUES CERULOPLASMINES ANIMALES .

I - PORC

Ainsi qu'il a été dit au début de cet exposé, la céruloplasmine a été découverte par HOLMBERG et LAURELL, dans le sérum de porc.

D'autres techniques, toutes inspirées de celle de HOLMBERG et LAURELL, ont été utilisées par divers auteurs pour isoler la céruloplasmine chez le porc.

Nous pouvons relever:

I) OSAKI (23) I960

Cette technique complexe comporte l'isolement par précipitation alcoolique d'une Fraction riche en céruloplasmine à p H 5,2, suivie de deux traitements successifs par le mélange alcool-chloroforme.

La céruloplamsine brute, ainsi obtenue, est chauffée à 70 ° C pendant 5 minutes - (élimination de protéines instables) - puis fractionnée au sulfate d'ammonium et finalement, soumise à l'electrophorèse de zone sur poudre de cellulose.

2) OSAKI , KAYA et coll. (24) I96I.

Cette technique dérive de la première méthode d' OSAKI, mais l'electrophorèse de zone est remplacée par une étape chromatographique sur DEAE-cellulose.

La céruloplasmine, à nouveau concentrée par le sulfate d'ammonium, est cristallisée à pH 5,2 en présence de sulfate d'ammonium saturé.

3) LEVINE et PAISACH (25) I963.

Ces auteurs réalisent, d'abord, un fractionnement au sulfate d'ammonium.

La fraction obtenue entre 35 et 50% de saturation est dissoute, puis précipitée par l'alcool (I5 % final).

Le précipité repris est ensuite traité par le mélange alcool - chloroforme; et la céruloplasmine brute, purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 5,7.

II - LAPIN

I) MORELL, IRVINE, STERNLIEB et SCHEINBERG (26) I967.

Isolèrent la céruloplasmine de lapin en soumettant tout d'abord le sérum, préalablement dialysé, à une chromatographie sur DEAE-cellulose.

Un volume d'éluat est traité par trois volumes du mélange alcool- chloroforme (9: I v/v) à 25 °C pendant 30 minutes.

Après centrifugation, le précipité est remis en suspension et précipité sur le sulfate d'ammonium à 3 ° C.

La céruloplasmine brute, ainsi obtenue, est à nouveau traitée par le mélange alcool-chloroforme.

2) BINETTE, MAC NAIR et CALKINS (27) I964.

ont fractionné le plasma de lapin afin de caractériser plusieurs protéines du plamsa de cet animal.

Ils se sont basés sur la méthode X de COHN .

(voir tableau II à la fin du chapitre).

La fraction enrichie en céruloplasmine est obtenue par extraction des Fractions II + III en présence de glycine et de I4 % d'éthanol.

III - SINGE (macacus Rhesus)

La céruloplasmine de ce singe a été isolée selon la méthode de BROMAN et KJELLIN (I4) par SFA - POSHNIKOV et coll. en I967 (28) .

La chromatographie sur DEAE Séphadex A50 est suivie d'une gel-filtration sur G I00, puis d'une seconde chromatographie sur colonne d' hydroxylapatite.

IV - POULET

La céruloplasmine de poulet a été isolée par STARCHER et HILL (29) en I966.

Leur méthode empruntée à BROMAN et KJELLIN (I4), associe les chromatographies sur DEAE Séphadex et sur hydroxylapatite.

V - GRENOUILLE

La céruloplasmine de grenouille a été isolée par INABA et FRIEDEN (30) en I967

Leur méthode est semblable à celle de DEUTSCH (I6), le chlorure de sodium étant remplacé par l'acétate de sodium.

TABLEAU I

METHODE 6 DE COHN

PLASMA

protéines	: 5,1%
pH	: 7,2
éthanol	: 8%
temp.	/ -3°C

PRECIPITE I

SURNAGEANT I

protéines	: 1,%
pH	: 6,9
éthanol	: 25 %
temp.	:-5°C

PRECIPITE II + III++

SURNAGEANT II+III

protéines	: 1,6%
pH	: 5,2
éthanol	: 18%
temp.	: -5°C

SURNAGEANT IV-I

PRECIPITE IV-I

protéines	: 1%
pH	: 5,8
éthanol	: 40%
temp.	: -5°C

SURNAGEANT IV-4

PRECIPITE IV-4

protéines	: 0,8%
pH	: 4,8
éthanol	: 40%
temp.	: -5°C

SURNAGEANT V

PRECIPITE V

protéines	: 3%
pH	: 4,5
éthanol	: 10%
temp.	:-3°C

Impuretés

SURNAGEANT

protéines	: 2,5%
pH	: 5,2
éthanol	: 40%
TEMP.	:-5°C

Surnageant

ALBUMINE

++La partie dite "9" de la méthode 6+9 de COHN concerne la séparation des protéines dans la Fraction II+III, comportant les y-globulines.

TABLEAU II

METHODE X DE COHN

PLASMA

éthanol = I9%
pH_+ = 5,8
Na^+ = 0,04

FRACTION IV+V+VI

IV - α_I- lipoprotéine
transferrine
sérum estérase
α_2-mucoprotéine
α_2-glycoprotéine

V albumine

VI peptide, urée, glucose
protéine facilement soluble
α_2- globuline
β_I- globuline
α_I -glycoprotéine

FRACTION I+II+III

Ethanol=I5%
pH_+ =5,5
Na^+ =0,005
Glycine=0,6

FRACTION I+III

I fibrinogène

III iso-agglutinine
prothrombine
β_I-lipoprotéine
plasminogène
et autres protéines

FRACTION II

γ- globuline

CHAPITRE II

La complexité des techniques que nous venons d'exposer montre que la céruloplasmine est, somme toute, une protéine assez difficile à purifier.

Par ailleurs, l'emploi du mélange alcool-chloroforme pour la dénaturation sélective des protéines accompagnantes ne nous semble pas depourvu de danger en ce qui concerne l'intégrité moléculaire de la céruloplasmine.

Il est vrai que la céruloplasmine résultant de ce traitement possède apparemment des propriétés physico- chimiques très satisfaisantes. Cependant , ce procédé pourrait aboutir à une sélection moléculaire car CARRICO, DEUTSCH et coll (3I) ont démontré récemment l'existence, dans le plasma humain, de IO à 20 % d'une céruloplasmine "incolore", " pauvre en cuivre ". Or, de telles préparations avaient été considérées, jusqu'à présent comme le résultat d'une dénaturation produite par les procédés de purification.

On ne peut pas exclure, non plus, la possibilité que la céruloplasmine résultant du traitement par

des solvants organiques à des températures relativement élevées ne corresponde pas à une protéine native mais à une céruloplasmine ayant subi une certaine altération, suivie d'une stabilisation dans la nouvelle configuration moléculaire.

Nous rappellerons dans ce contexte, le cas du plasminogène purifié selon le procédé de KLINE (32) comportant des pH extrêmes. Ce proenzyme avait une excellente activité enzymatique après activation, mais des études ultérieures ont montré que l'enzyme avait subi des modifications et le plasminogène natif, obtenu à l'aide de techniques plus ménageantes, possède, en fait, une activité plus faible que l'ancien plasminogène de "KLINE".

CHANUTIN et coll. (33) avaient observé, il y a une quinzaine d'années, l'effet précipitant de certains acides gras à chaîne courte.

Ces auteurs avaient constaté que les γ -globulines précipitaient moins que d'autres protéines plasmatiques.

Dans notre laboratoire, lors de la mise au point des préparations de l'IgA (34), nous avons pu précipiter l'α 2 macroglobulaine par l'acide caprylique, laissant l'IgA seule dans le surnageant: cette observation était à la base de la mise au point d'une technique de préparation des IgG à partir du plasma ou du sérum total. (35)

Cette étude a montré la présence constante de

la céruloplasmine dans le surnageant caprylique.

Cette constatation est à la base de l'élaboration d'une technique spécifique de purification de la céruloplasmine dont voici les critères pour le plasma humain:

EXTRACTION DE LA CERULOPLASMINE A PARTIR DE PLASMA HUMAIN .

Le plasma provient de sang recueilli sur ACD et titre environ 60 g de protéines par litre.

ACD =	acide citrique	: I,66 g
	soude	: 0,60 g
	eau distillée	: q.s.p I00 ml
	glucose	: 3 g.

Il est amené à pH 5 à l'aide d"acide acétique 0,I M (soit environ 600 ml par litre de plasma).

On ajoute goutte à goutte, 80 g d'acide caprylique par litre de plasma de départ et on laisse agiter à température ambiante durant 40 mn. Cette opération aboutit à l'élimination de la plupart des protéines plasmatiques.

Le surnageant, obtenu après centrifugation à haute vitesse, contient, outre la céruloplasmine, l'orosomucoïde (ou α I glycoprotéine acide) , la préalbumine et les immunoglobulines.

Le pH est alors porté à 5,7 et la solution est diluée jusqu' à une concentration saline égale à celle du tampon utilisé: acétate de sodium 0,I M de pH 5,7.

On effectue alors, la purification par chromatographie sur DEAE-cellulose (du type DE 52 Whatman) équilibrée contre du tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7 à raison de 8 g de cellulose essorée humide

par gramme de protéine.

L'adsorption de la céruloplasmine est effectuée en batch et les protéines contaminantes (les immunoglobulines n'étant pas adsorbées) éliminées par un lavage soigneux. On a adopté cette technique enbatch afin d'éviter un contact trop prolongé entre la céruloplasmine et la cellulose.

On procède à l'élution de la céruloplasmine à l'aide de tampon acétate de sodium 0,25 M de pH 5,7.

Cette élution est effectuée sur colonne afin d'obtenir un éluat relativement concentré. celui-ci contient outre la céruloplasmine, l'orosomucoïde et la préalbumine . Ces deux protéines ont un poids moléculaire beaucoup plus faible (44 I00 pour la première et 6I 000 pour la seconde) que la céruloplasmine, et l'on peut aisément séparer celle-ci par gel- filtration sur G I00 (Fig I).

On a recueilli séparément chacun des éluats correspondant à un pic dans le graphique d'enregistrement de la figure I et on les a identifiés en les soumettant à des migrations électrophorétiques sur acétate de cellulose en tampon veronal-veronal sodé 0,05 M de pH 8,6 (fig 2).

Cependant l'expérience prouve que l'on pouvait obtenir la céruloplasmine humaine à l'état cristallisé (Fig 3) en soumettant l'éluat, amené à une concentration protéique de 3 %, à des dialyses successives contre du tampon acétate de sodium 0,0I5 M de pH 5,3, selon le procédé de DEUTSCH (I6).

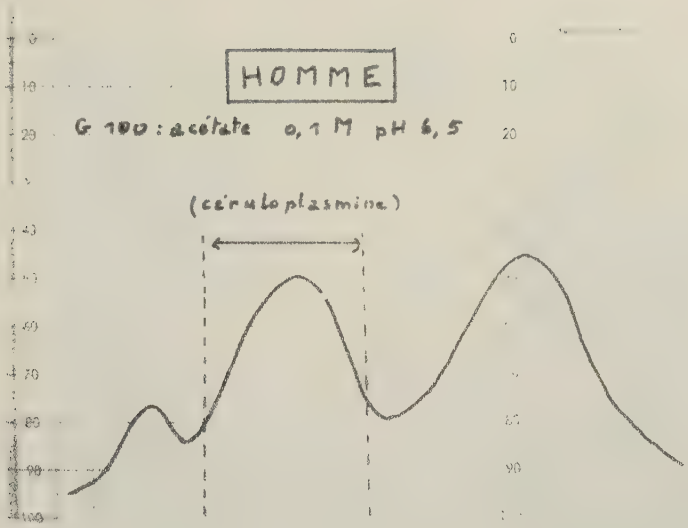
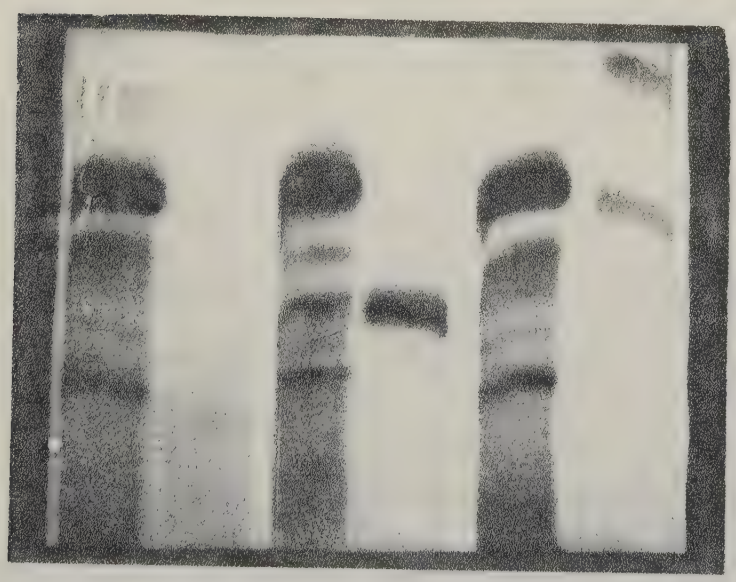


Fig I: Graphique d'enregistrement de la gel-filtration sur Séphadex G I00



I 2 3

HOMME

Fig 2: Migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration

I) Premier pic: traces d'IgA globuline
2) Deuxième pic: céruloplasmine
3) Troisièmr pic: cromucoïde , préalbumine.

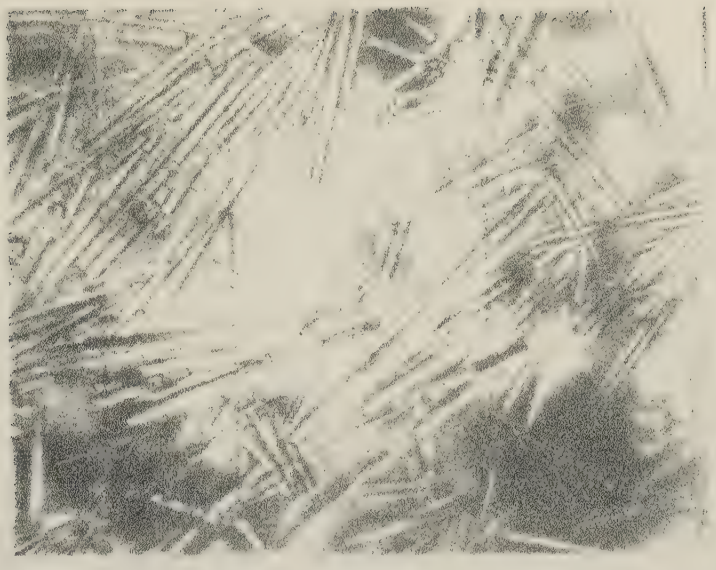


Fig 3: Cristaux de céruloplasmine humaine
(grossis environ 350 fois)

La céruloplasmine obtenue par cette méthode répond, après deux cristallisations, aux critères habituels de pureté:

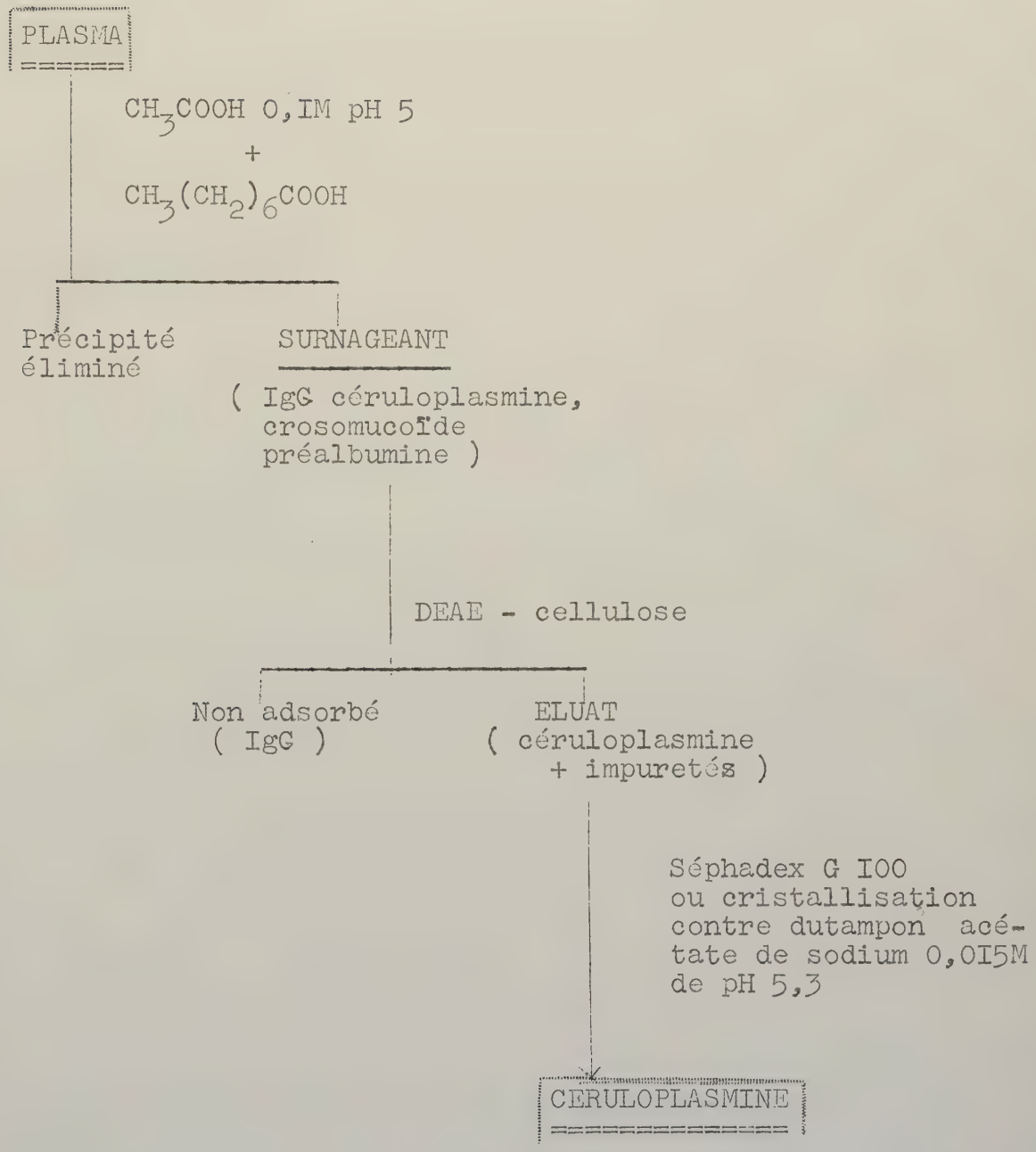
- teneur en cuivre
- rapport d'absorption
- homogénéité à l'ultracentrifugation
- analyses électrophorétiques.

(voir chapitre III)

Les résultats satisfaisants obtenus pour la purification de la céruloplasmine humaine nous ont amené à opter pour cette technique pour la préparation des céruloplasmines animales.

Toutefois, de légères modifications se sont révélées nécessaires lors de l'application du procédé au différent plasma d'animaux.

SCHEMA DE L'ISOLEMENT DE LA CERULOPLASMINE A PARTIR de PLASMA HUMAIN



EXTRACTION DE LA CERULOPLASMINE A PARTIR DE PLASMAS ANIMAUX

I - MATIERE PREMIERE

Nous avons, tout d'abord, essayé de travailler avec du plasma ou du sérum congelé, provenant de laboratoires commerciaux travaillant dans les abattoirs. Mais l'expérience a montré qu'il était pratiquement impossible d'obtenir des préparations satisfaisantes dans ces conditions; et, par la suite, nous avons travaillé avec du plasma frais.

Dans tous les cas, le sang a été recueilli sur ACD, et le plasma séparé des éléments figurés du sang quelques heures seulement après le prélèvement.

Le plasma, conservé au maximum 48 heures à + 4°C a été aussitôt soumis au fractionnement proprement dit.

De plus, on a cherché à n'utiliser que des plasmas d'animaux adultes. On sait, en effet, que, chez l'homme, le plasma du nouveau-né ne contient que très peu de céruplasmine- environ 20 % du taux de céruloplasmine du plasma maternel-(36)-, et l'on a pu constater que la proportion de céruloplasmine est également très faible faible dans le plasma des animaux très jeunes.

Ceci peut être rapproché des résultats publiés par INABA et FRIEDEN (30), à la suite de leur étude de l'évolution de l'activité oxydasique du plasma durant les métamorphoses du têtard.

Les animaux suivants ont été étudiés :

- Cheval
- Mulet
- Lapin
- Chèvre
- Brebis
- Babouin.

II - REACTIFS.

L'acide caprylique utilisé est de l'acide octoïque spécialement pur B.D.H. (The British Drug House). En effet, les travaux concernant le plasma humain nous avaient montré la nécessité d'un acide caprylique très pur.

Pour la chromatographie sur échangeur d'ions, nous avons utilisé la DEAE-cellulose , WHATMAN DE. 52 et pour la gel-filtration, le SEPHADEX G I00, G I50, G 200.

III - MATERIEL

Pour les chromatographies, on a employé des

colonnes du type PHARMACIA, ayant une hauteur de I20 cm et un diamètre de 2,5 cm.

Les courbes ont été tracées à l'aide d'une cellule de mesure et d'un enregistreur L.K.B.

Les centrifugations ont été réalisées sur des centrifugeuses refroidies de type SORVALL RC 2 et MISTRAL 6 L.

IV - EXPERIENCES.

C H E V A L

Le plasma utilisé provient du sang de chevaux élevés dans les animaleries de l'INSTITUT PASTEUR.

Les protéines du plasma sont amenées , au besoin, à une concentration de 5 % à l'aide de chlorure de sodium à 0,9 %. Le pH est ensuite ajusté à 5 à l'aide d'acide acétique 0,I M ; puis on précipite la plupart des protéines par l'acide caprylique à raison de 48 g d'acide caprylique par litre de plasma d e départ.

Le mélange est agité durant une demi-heure à la température 25° C, puis centrifugé à haute vitesse (6 000 tours / minute au minimum).

Le précipité est suspendu à nouveau dans du tampon acétate de sodium 0,I2 M de pH 5 et éliminé après nouvelle centrifugation.

Le surnageant résultant de la précipitation caprylique contient, comme dans le cas du fractionnement du plasma humain, les immunoglobulines, une α2 globuline (la céruloplasmine), une α I globuline et la préalbumine.

L'Opération chromatographique suivante est effectuée en vue de séparer la plupart des immunoglobulines (des protéines plus) acides. L'adsorption de celle-ci est effectuée en batch, sur DEAE-cellulose équilibrée en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7, à raison de 8 g de cellulose essorée humide par gramme de protéine. On procède à plusieurs lavages avant de verser la cellulose dans une colonne, puis on élue la céruloplasmine avec du tampon acétate de sodium 0,25 M de pH 5,7 .

La céruloplasmine, à nouveau concentrée, est enfin purifié sur colonne de Séphadex G I00, préalablement équilibrée en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 6,5 (fif 4.).

On a étudié par migration électrophorétique sur acétate de cellulose les éluats correspondant aux trois pics enregistrés au cours de la gel-filtration (Fig.5). La protéine bleue correspond au deuxième pic.

Nous concentrons de nouveau la céruloplasmine par adsorption sur DEAE-cellulose équilibrée en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7; la céruloplasmine étant éluée avec du tampon acétate de sodium 0,5M de pH 5,7.

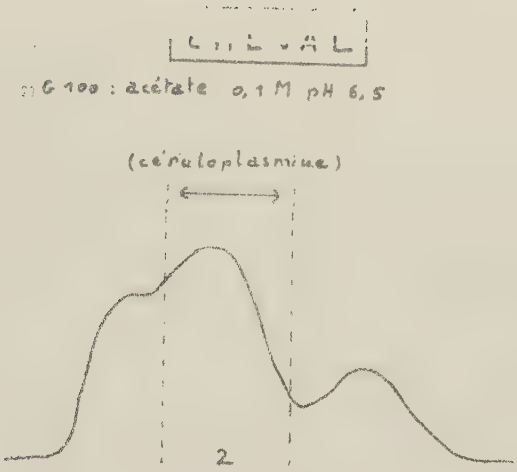


Fig 4: Graphique d'enregistrement de la gel-filtration sur Séphadex G I00

I 2 3

CHEVAL

Fig 5- Migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration

I) Premier pic: I globuline, un peu de céruloplasmine, des traces d'αI globuline
2) Deuxième pic: céruloplasmine
3) Troisième pic: préalbumine

R E M A R Q U E S

I) Précipitation par l'acide caprylique.

La précipitation complète des protéines précipitables par l'acide caprylique dépend:

- de la température

qui est optimale entre 20°C et 25°C.

En effet, l'expérience nous a montré que la composition protéinique du surnageant varie avec la température.

La précipitation par l'acide caprylique a été effectuée successivement à 5°C , + IO°C + I5°C, + 20°C et 25°C. Nous avons constaté que plus la température de précipitation est basse moins les protéines précipitent. En effet, à +5°C, et même à + IO ° C, la plupart des protéines plasmatiques restent dans le surnageant; seules les α I globulines précipitent. A + I5°C, la majeure partie des protéines précipitent, néammoins toute l'albumine n'est pas précipitée. A partir de 20°C seulement, le surnageant ne contient plus que, outre la céruloplasmine, les immunoglobulines, l'α I globuline et la préalbumine. Il semblerait qu'au dessous de cette température, l'acide caprylique étant loin de sa température de fusion, la précipitation ne se fait pas en milieu homogène. La céruloplasmine ne risque pas d'être détruite, car elle peut être stérilisée à 60 ° C, sans altération, comme l'ont montre SGOURIS et coll . (8).

- de la quantité du réactif précipitant établie d'après les essais préliminaires.

- de la vitesse d'addition du réactif précipitant.

- de l'agitation.

On a constaté qu'il était préférable de procéder à une agitation régulière, de vitesse moyenne, afin d'éviter une trop grande formation de mousse qui nuit au contact entre l'acide caprylique et le plasma.

2)- Gel - filtration.

Il est parfois nécessaire d'effectuer une seconde filtration sur Séphadex G IOO en ne retenant que le haut du pic détecté par l'enregistreur L.K.B.

En effet, la filtration sur Séphadex G IOO paraît une condition essentielle pour la purification des céruloplasmines animales car les tentatives de cristallisation des céruloplasmines animales se sont toutes révélées infructueuses, malgré des conditions de pH et de force ionique différentes. Bien plus, la céruloplasmine de cheval s'est dénaturée au cours des essais infructueux pour obtenir des cristaux par dialyse prolongée à +4 ° C, alors que la céruloplasmine humaine cristallise rapidement dans ces conditions; (moins de 24 heures) . Cependant, nous avons constaté, pour la céruloplasmine humaine, que des préparations purifiées par gel-filtration possédaient des critères de pureté tout à fait comparables à celle qui avaient été cristallisées. (Voir Chapitre III).

MULET

Nous n'avons pu effectuer qu'une expérience, n'ayant eu q'une fois un échantillon suffisant de sang de mulet, aimablement mis à notre disposition par l'Institut PASTEUP .

La céruloplasmine a été isolée exactement de la même manière pour le mulet et pour le cheval, et les mêmes remarques s'appliquent à l'un et l'autre animal. Néammoins, nous avons dû apporter une modification lors de la précipitation par l'acide caprylique, nous avons précipité les protéines du plasma avec 20 g d'acide caprylique B D H par litre de plasma, au lieu de 48 pour le cheval; ceci parce que:

a) le plasma employé avait un taux de protéines assez faible (4%)

b) le test de RAVIN à la p-phenylène-diamine indiquait, en densité optique un chiffre beaucoup plus faible que pour le cheval.

Il peut s'agir d'un cas particulier, car les expériences n'ont porté que sur un lot de plasma. Or l'âge du sujet influe sur la teneur en céruloplasmine peut-être étions-nous en présence d'un animal très jeune.

Les figures 6 et 7 nous donnent, d'une part la courbe obtenue au cours de la gel-filtration, d'autre part , l'examen par migration électrophorétique des différents pics obtenus.

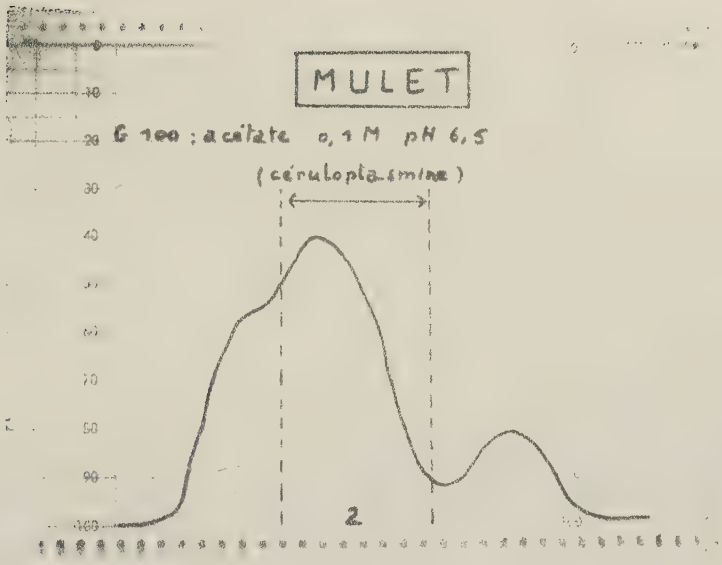


Fig 6: Graphique d'enregistrement de la gel-filtration sur Séphadex G IOO

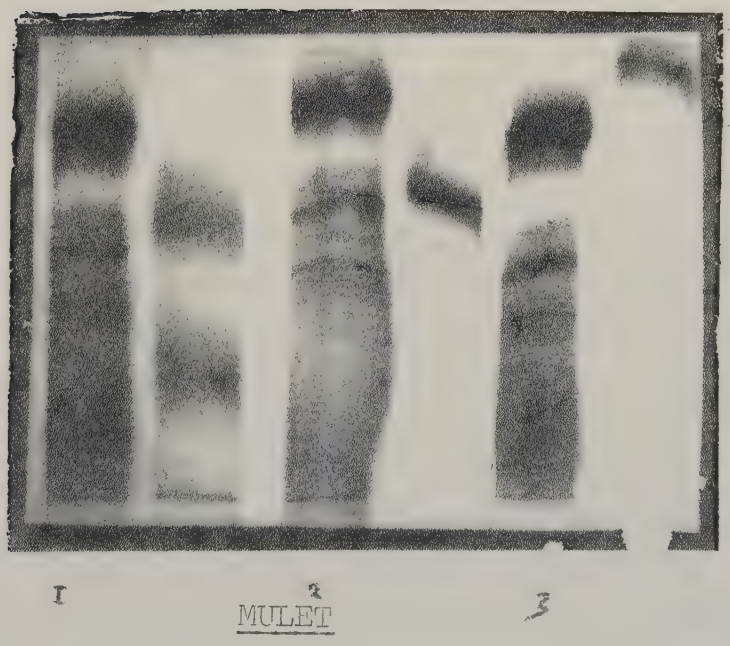


Fig 7: Migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration

I) premier pic: I globuline, un peu de céruloplasmine, des trace d'α globuline.
2) deuxième pic: céruloplasmine
3) troisième pic : préalbumine.

LAPIN

Le sang de lapin a été fourni par l'animalerie du CENTRE NATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE, ce qui a permis d'opérer dans des conditions particulièrement favorables.

Le taux moyen des protéines de ce plasma n'est que d'environ 5 %, ce qui correspond aux observations de BINETTE et coll. (27), qui consta te que le plasma de lapin est moins riche en protéines que le plasma humain.

Avant d'effectuer la précipitation des protéines par l'acide caprylique, on ajuste le pH à 5 à l'aide d'acide acétique 0,8 N . Puis on ajoute lentement l'acide caprylique, à raison de 52 g de réactif par litre de plasma de départ.

On lave le précipité avec du tampon acétate de sodium 0,I2 M à PH 5, le surnageant, complété par les eaux de lavage, est soumis à une première chromatographie sur DEAE-cellulose équilibrée en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7, l'adsorption s'effectuant en batch, en présence de 8 g de cellulose essorée humide par gramme de protéine. La cellulose est lavée à l'aide du même tampon, puis versée dans une colonne. La céruloplasmine est éluée à l'aide de tampon acétate de sodium 0,25 M de pH 5,7.

La céruloplasmine brute, ainsi obtenue, est à nouveau adsorbée sur DEAE-cellulose, également équilibrée en tampon acétate de sodium 0,IM de pH 5,7, à raison de 35 grammes de cellulose essorée humide par gramme de protéine. L'adsorption s'effectue toujours en batch. Puis la cellulose est lavée plusieurs fois et l'élution effectuée sur colonne à l'aide de tampon acétate de sodium 0,5M de pH5,7.

Enfin comme pour la céruloplasmine de cheval, nous procédons à la purification finale de la protéine par gel- filtration sur Séphadex G IOO (fig.8) équilibré en tampon acétate de sodium 0,IM de pH 6,5. Il est à noter comme le montre le diagramme, qu'il n'y a pas de protéine à faible poids moléculaire.

La céruloplasmine est ensuite concentrée par adsorption sur DEAE-cellulose en tampon acétate de sodium 0,IM de pH 5,7 et éluée avec de l'acétate de sodium 0,5M de pH 5,7.

La figure 9 représente l'examen par migration électrophorétique du diagramme obtenu.

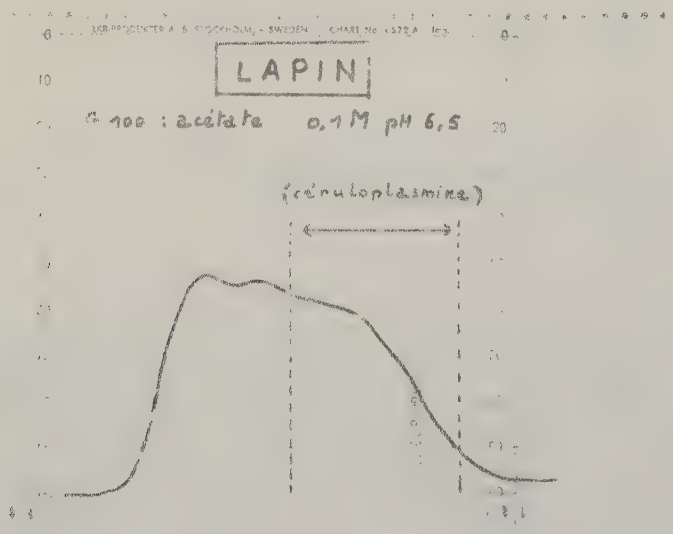
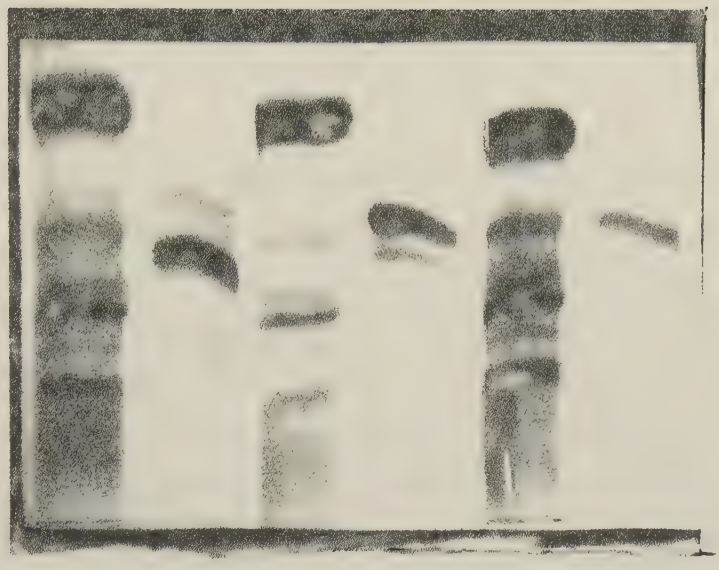


Fig 8- Graphique d'enregistrement de la gel-filtration sur Séphadex G. IOO



1 2 3

LAPIN

Fig 9: migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration.

On identifie : I) γ I globuline, céruloplasmine à faible teneur en cuivre chromophore (bande lente) traces de céruloplasmine à forte teneur en cuivre chromophore (bande rapide)

2) :céruloplasmine "lente"et " rapide"

3) : céruloplasmine " rapide" à forte teneur en cuivre chromophore

REMARQUE

L'origine du sang a permis de connaître avec précision l'âge des sujets et l'on a pu ainsi vérifier ce qui a été signalé au début de ce chapitre quant à la faible teneur en céruloplasmine des plasmas de sujet trop jeunes

CHÈVRE

La collecte du sang de chèvre a été pplus difficile que pour les animaux précédents, ainsi que le montrent les provenances diverses du lot utilisé: INSTITUT PASTEUR DE PARIS, CENTRE DE TRANSFUSION SANGUINE DE MARSEILLE.

Pour cet animal, la fraîcheur du plasma s'est révélée particulièrement importante.

Le plasma est amené à une teneur d'environ 5 %de protéine à l'aide de chlorure de sodium à 0,9 %, puis, on ajuste le pH à 5,5 à l'aide d'acide acétique 0, I N.

On effectue alors la précipitation des protéines à éliminer par l'acide caprylique à raison de 20 g d'acide caprylique par litre de plasma de départ, en laissant agiter durant une demi-heure à la température de 25 ° C.

On centrifuge et on lave le précipité avec du tampon acétate de sodium 0,I2 M de pH 5. Le surnageant, complété par le lavage, est soumis à une première chromatographie: l'adsorption s'effectue en batch à raison de IO g de cellulose essorée humide par gramme de protéine (cellulose équilibrée avec du tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7) . On lave plusieurs fois la cellulose avant de former une colonne; puis on élue la céruloplasmine avec du tampon acétate de sodium 0,25 M de pH 5,7.

On procéde à une purification par un deuxième chromatographie, en adsorbant à nouveau le céruloplasmine sur DE 52 équilibrée en tampon acétate de sodium

0,I M de pH 5,7 (35 g de cellulose essorée humide par gramme de protéine étant utilisés)

L'adsorption, comme précédemment, est effectué en batch; avant la formation d'une colonne, la cellulose est lavée plusieurs fois avec du tampon acétate de sodium de même molarité et de même pH que précédemment. La céruloplasmine est alors éluée avec du tampon acétate de sodium 0,5 M de pH 5,7.

Finalement, on purifie la céruloplasmine apr gel-filtration sur Séphadex G IOO équilibré en tampon acétate de sodium de pH 6,5 et de molarité 0,I M(fig IO) Comme pour le lapin le diagramme révèle l'absence de protéines à faible masse molaire telles que les α glc - bulines et préalbumine.

La figure II représente l'examen par migration électrophorétique du diagramme obtenu.

REMARQUES:

I) Le test de RAVIN à la p-phénylène diamine ayant révélé un faible taux de céruloplasmine dans le plasma de chèvre, (80 en densité optique; longueur d'onde 530 mμ), on a été amené à utiliser une quantité assez faible d'acide caprylique.

2) La faible quantité d'acide caprylique uti - lisée donne une séparation moins sélective de la céruloplasmine nécessitant une deuxième chromatographie.

Par ailleurs , la céruloplasmine de chèvre s'est révélée particulièrement labile à pH acide (perte d'ions cuivriques) ce qui a nécessité un pH plus élevé lors de la précipitation; mais dans ces conditions, celle-ci est également moins spécifique.

3) Par contre, une seule purification sur colonne de Séphadex G IOO est suffisante, car on peut constater qu'il n'y a pas d'α I globuline comme contaminant.

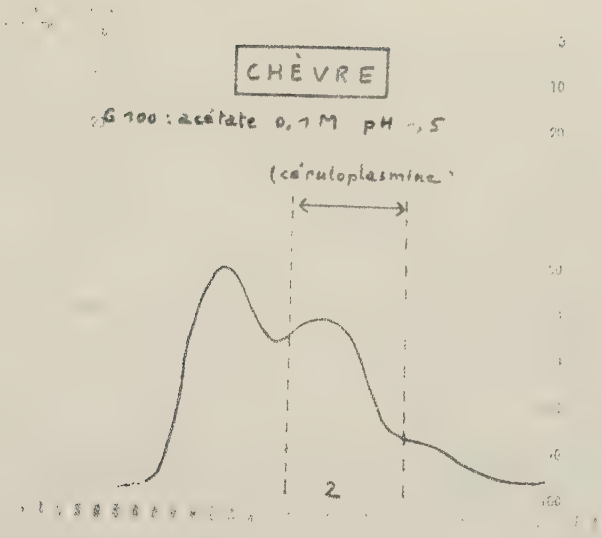


Fig IO: Graphique d'enregistrement de la gel-filtration sur Séphadex G IOO

CHEVRE

Fig II: Migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration

I) γ I globuline, traces de céruloplasmine

2) céruloplasmine, lente, à faible teneur en cuivre chromophore;
rapide; à forte teneur en cuivre chromophore.

BREBIS

Le sang de brebis utilisé a été entièrement fourni par l'animalerie de l'Hopital Broussais.

De même que les conditions expérimentales pour l'isolement des céruloplasmines de cheval et de mulet sont fort peu différentes, la technique utilisée dans le cas de la brebis est très voisine de celle exposée pour la chèvre.

Deux modifications seulement ont été apportées, au stade de la précipitation par l'acide caprylique:

- a) on a utilisé un peu plus de réactif que précédemment, soit 30 g par litre de plasma de départ.
- b) On est revenu au pH 5 de la technique originale.

Les figures I2 et I3 nous donnent, d'une part la courbe obtenue au cours de la gel-filtration, d'autre part, l'examen par migration électrophorétique des pics obtenus.

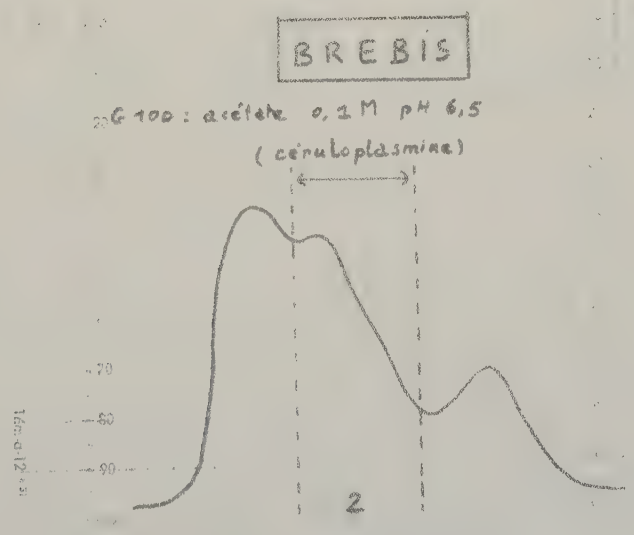
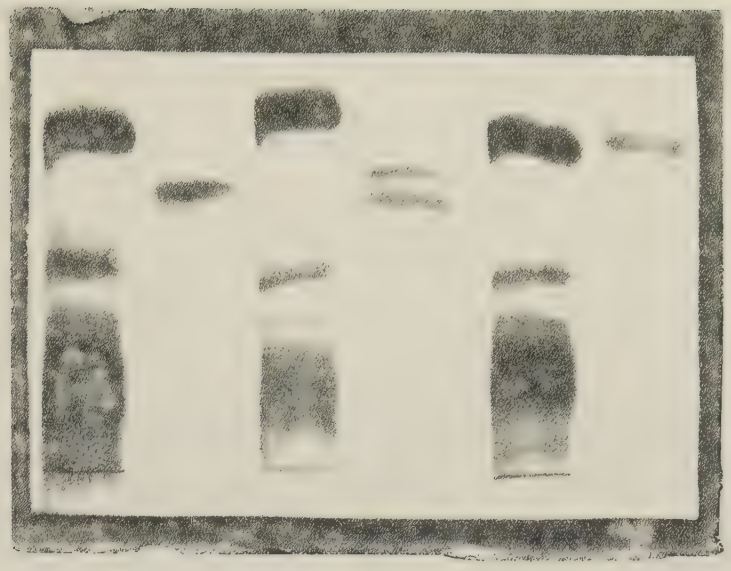


Fig I2: graphique d'enregistrement de la gel-filtration sur Séphadex G I00



I 2 3

BREBIS

Fig I3. Migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration.

On identifie:
I) traces de γ I globuline, céruloplasmine rapide, à faible teneur en cuivre chromophore
2) Céruloplasmine
(rapide, à faible teneur en cuivre chromophore, lente, à forte teneur en cuivre chromophore)
3) α I globuline, un peu d'albumine, traces de préalbumine.

BABOUIN

Le sang de babouin nous a été fourni par l'animalerie de l'INSTITUT PASTEUR DE GARCHES.

Nous nous sommes heurtés à une série de difficultés pour l'isolement de la céruloplasmine chez cet animal.
Nous n'avons pu obtenir de renseignements concernant la nourriture et le traitement particuliers appliqués à ces animaux avant de les sacrifier. Toutefois, il semble que les babouins aient été anesthésiés par le chloroforme puis tués par une ponction intracardiaque. Le sang n'a donc pas été récolté dans les mêmes conditions que pour les autre animaux.

La technique habituellement employée avec succès tant chez l'homme que chez les animaux précédemment étudiés, nous a donc posé un certain nombre de problèmes.

Dès la première étape, à savoir la précipitation de la plupart des protéines par acide caprylique, nous avons rencontré le premier obstacle : le surnageant; très difficilement decantable, présentait, en effet, l'aspect d'une suspension colloïdale, non adsorbable sur DEAE-cellulose.

Nous avons songé à un excès de lipo-protéines

chez cet animal. Nous avons essayé d'y remédier en soumettant le plasma à un traitement préalable à l'alcool iso- amylique selon la technique de BURSTEIN (37). Néammoins les résultats ont été peu satisfaisants; de plus, un traitement à l'alcool amylique ne peut que nuire à l'intégrité d'une protéine aussi labile que la céruloplasmine.

Après plusieurs essais, nous avons adopté la solution suivante:

A un volume de plasma babouin, préalablement traité par passage d'un mélange composé de 95% d'oxygène et de 5 % de dioxyde de carbone, on ajoute un volume d'eau distillée. Le plasma ainsi dilué est amené à pH 5,5 à l'aide d'acide acétique 0,I N. On précipité la plupart des protéines à l'aide de 30g d'acide caprylique par litre de plasma de départ. Le précipité est lavé et le surnageant additionné des eaux de lavage, est soumis à une chromatographie sur DEAE-cellulose équilibrée en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 5,7.

L'adsorption de la céruloplasmine se fait en batch, comme d'habitude, et la céruloplasmine, ainsi que les impuretés qui l'accompagnent, sont éluées à l'aide de tampon acétate de sodium 0,25 M de pH 5,7, après un lavage convenable de la cellulose.

Les ions cuivriques de la céruloplasmine de babouin étant particulièrement instables à pH acide, on concentre immédiatement la solution éluée avec 33% de sulfate d'ammonium à + 3 °C, et le précipité bleu est repris puis dialysé contre du tampon acétate de sodium 0,I M, mais cette fois-ci, à pH 6,5.

On purifie la céruloplasmine brute ainsi obtenue par gel - filtration sur Séphadex G IOO (fig I4) en tampon acétate de sodium 0,I M de pH 6,5; mais cette opération nécessitant plusieurs heures s'est révélée très décevante; la céruloplasmine se décolore au fur et à mesure; ce qui peut être expliqué par une perte progressive en ions cuivriques.

La figure I5 représente l'examen par migration électrophorétique des pics obtenus.

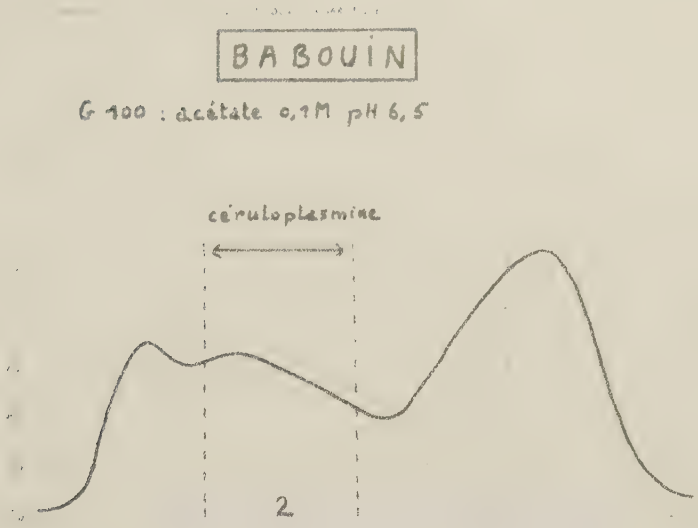
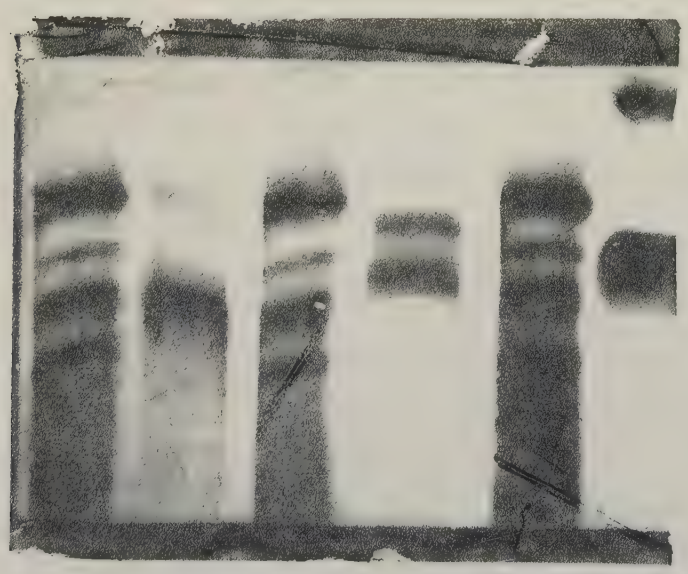


Fig I4: Graphique d'enregistrement de la gel-filtration sue Séphadex G I00



I 2 3

BABOUIN

Fig I5: Migration électrophorétique sur acétate de cellulose des produits obtenus lors de la gel-filtration

I) α2 globuline(haptoglobine) des traces de céruloplasmine et d'α 2 lipo-protéine

2) céruloplasmine(la bande très accélérée est égaler de la céruloplasmine- voir Chap III)

3) Orosomucoïde; préalbumine

Les différentes protéines ont pu être identifiées à l'aide d'anti sérums anti-protéines humaines, utilisables dans le cas du babouin.

CHAPITRE III

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

Ainsi qu'il a été dit plus haut, nous n'avons pas considéré que la gel-filtration ait lieu d'être complétée par une cristallisation, au cours de laquelle la protéine risquait d'être dénaturée, et l'on a étudié les céruloplasmines obtenues selon la méthode exposée dans le précédent chapitre du point de vue de certaines propriétés physico- chimiques qui sont des critères de pureté.

Les études faites sont les suivantes:

- ETUDE ELECTROPHORETIQUE
- ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE
- ACTIVITE ENZYMATIQUE
- TENEUR EN CUIVRE: RAPPORT A 610 mμ / A 280 ½ mμ
- ETUDE DES PEPTIDES PAR ELECTRO-CHROMATOGRAPHIE après digestion trypsique de la protéine performylée
- DOSAGE DES HEXOSES, HEXOSAMINES, ACIDES SIALIQUES
- ETUDE IMMUNOCHIMIQUE
- DETERMINATION DES ACIDES N-TERMINAUX

Il aurait été logique que cette étude figure dans notre énumération, en même tamps que l'étude des peptides. Mais cette analyse n'a été que très incomplète; en dehors de la céruloplasmine humaine, nous n'avons pu l'expérimenter que sur deux animaux.

A - PRINCIPES DES METHODES EMPLOYEES

I - ETUDE ELECTROPHIRETIQUE.

I) SUR ACETATE DE CELLULOSE.

Les séparations électrophorétiques sont pratiquées à température ambiante, sur des membranes d'acétate de cellulose du type " cellogel ", en tampon véronal- véronal sodé 0,05 M de pH 8,6; - on a préféré éviter, puisque le choix est possible, le tampon tris-véronal, la présence du tris (tris-hydroxyméthyl- amino- méthane) pouvant porter atteinte à l'intégrité moléculaire de la céruloplasmine (KASPER et DEUTSCH 38). La migration électrophorétique s'effectuait durant 2h I5 min., avec un champ de 7 V/cm.

On a utilisé les membranes les plus larges (4 X I7 cm) afin de pouvoir déposer sur la même bande un plasma témoin provenant de la même espèce animale, permettant ainsi d'apprécier la mobilité de la céruloplasmine en fonction des autres protéines plasmatiques. En effet d'une membrane à l'autre, de légers décalages de migration, qui feraient une observation comparative, peuvent se produire, en cours de migration, dans une même cuve.

La révélation a été faite à l'aide d'amido-schwarz à I% dissous un mélange éthanol-eau, volume à volume, contenant IO % d'acide acétique. Les bandes

sont immergées durant 5 minutes dans ce colorant et la décoloration est pratiquée à l'aide de bains successifs dans le solvant. La transparence des membranes est obtenue en les plongeant durant quelques minutes, avant séchage à chaud, dans une solution de méthanol en milieu acide-acétique contenant I % de glycérol.

La révélation spécifique de la céruloplasmine a été effectuée en présence de para-phénylène-diamine en déposant après migration, sur la membrane d'acétate de cellulose, une bande de papier (types Arches 302), imprégnée au préalable d'une solution de para-phénylène- diamine à 0,5% en tampon acétate de sodium IM de pH 5. On a laisser incuber à 37 ° C, à l'abri de la lumière ,pendant 5 minutes, puis on a retiré la bande de papier , laissant la coloration se développer.

2) - SUR GEL D'AMIDON .

Dans notre laboratoire, on emploie généralement la micro-technique sur gel d'amidon selon la méthode de MOURAY, MORETTI et FINE (39) . Cette technique donne des résultats très satisfaisants et présente surtout l'avantage d'être très rapide; elle permet ainsi une interprétation du résultat obtenu au cours du fractionnement des protéines. La tec hnique classique d'électrophorèse sur gel d'amidon donne un grossissement plus important et, par conséquent, une image plus nette et plus détaillée. On l'a donc préférée dans le cas présent, puisqu'elle constitue pour la protéine isolée un critère analytique plus rigoureux.

La méthode utilisée est celle de SMITHIES (40), en tampon discontinu de POULIK : tris-borate

Comme pour les expériences sur acétate de cellulose, la révélation a été faite à l'aide d'une solution d'amido- schwarz à I% dans le même solvant et la coloration spécifique a été pratiquée exactement de la même manière que précédemment, le papier utilisé étant, cette fois , des feuilles de papier " Whatman n° 3 ".

3) SUR GELOSE .

A titre de vérification supplémentaire, un contrôle a été effectué en utilisant la gélose comme support, selon la techniquedécrite par GRABAR et BURTIN (4I).

On emploi un gel de gélose à une concentration finale de I,5 % en tampon véronal de pH 8,2 et de faible force ionique (migration 4 heures, sous 5V/cm).

II - ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE.

La technique utilisée est celle pratiquée dans les laboratoires de la station Centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S., dirigé par Madame FILITTI-WURMSER.

Elle emploie une centrifugeuse SPINCO, modèle E dont le principe repose sur la mesure de la différence entre les indices de réfraction du tampon et de la solution à une concentration donnée, cette mesure étant faite à divers instants de la centrifugation.

On peut ainsi suivre la position de la frontière qui s'établit, au cours de la sédimentation, entre la substance sédimentée et le milieu de suspension.

La solution protéique examinée est à une concentration de 0,6 %, la vitesse de régime est de 59 mille 780 tours /minute, la durée de démarrage oscille, selon les expériences, entre I3 et 2I minutes et l'inclinaison de la barre est de 60.

Les résultats sont enregistrés graphiquement et photographiés.

III - DOSAGE ENZYMATIQUE .

La technique utilisée est la mesure spectrophotométrique des produits colorés formés par l'oxydation de la para- phénylène- diamine sous l'action de la céruloplasmine.

RAVIN, a proposé, dès I956, un test simple de mesure de l'activité de la céruloplasmine, fondé sur l'apparition de la couleur pourpre résultant de l'oxydation de la para-phénylène - diamine.

De nombreuses variantes de cette technique ont été proposées. Nous nous sommes basés sur la méthode de HENRY et coll (43) .

Dans cette technique, la concentration de la céruloplasmine est determinée en fonction de la vitesse d'oxydation de la para-phénylène-diamine à 37° C

et à pH 6, en tampon acétate de sodium 0,I M. Les mêmes expériences ont été effectuées à pH 5,8. En effet, BINGLEY et DICK (44), en I969, signalent que le pH optimal peut varier d'une espèce à l'autre . Il importait donc de vérifier que, pour les animaux étudiés, c'est à pH 6 que, comme pour l'homme, on relève la meilleure activité.

La réaction enzymatique est stoppée par addition d'azothydrate de sodium à 0,I %, en tampon acétate de sodium 0,I M, dont on connait l'effet inhibiteur sur l' activité oxydasique de la céruloplasmine, cependant que les tubes servant à l'expérience sont plongés dans un bain d'eau glacée. Le produit d'oxydation montre un maximum d'absorption à 520 - 530 mμ mesuré, dans notre cas, à l'aide d'un spectrephotomètre BECKMAN D.U. Le chiffreobtenu est comparé à celui donné par un "blanc " où l'activité oxydasique de l'enzyme a été immédiatement bloquée par la présence d'azothydrate de sodium.

Une unité d'activité est définie, par HENRY et coll., comme une augmentation de 0,00I en densité optique de l'absorption à 530 mμ pendant 30 minutes, l'observation étant faite entre la I0ème et la 40ème minute de l'expérience.

IV - TENEUR EN CUIVRE.

I) MESURE DU RAPPORT D'ABSORPTION A 610 mμ ET 280 mμ

Ce dosage a été introduit par SCHEINBERG et MOREIL (45).

Dans sa forme actuelle, il consiste à comparer l'absorption de l'ultraviolet de longueur d'onde 280mμ par la protéine, en fonction de sa teneur en tyrosine et en tryptophane, et l'absorption de la longueur d'onde 6IO mμ par cette même protéine en fonction du complexe cuivrique qui lui donne sa couleur bleue.

Les lectures sont effectuées sur un spectrophotomètre JOBIN et YVON stand. M.V.

La protéine est diluée avec un tampon acétate de sodium 0,2M de pH 5,2, de manière à obtenir une solution à 0,05% de protéine.

Cette solution est placée dans une cuve en quartz. Une cuve identique ne contenant que le tampon acétate de sodium qui sert de solvant à la céruloplasmine est utilisée comme témoin et permet de régler le zéro du spectrophotomètre.

La fente-source de l'appareil peut être éclairée à l'aide d'une lumière de longueur d'onde connue, convenablement choisie. Cette lumière traversant le liquide contenu dans la cuve de quartz, y subit une absorption spécifique d'un élément bien déterminé de cette solution. Une mesure photomètrique de l'énergie lumineuse qui a traversé la cuve témoin et de celle transmise par la solution étudiée, permet d'établir le coéfficient d'extinction de la solution pour la longueur d'onde considérée.

Puisqu'il s'agit de solutions diluées, la loi de BEER permet d'énoncer que le coéfficient d'absorption est proportionnel à la concentration de l'élément absorbant et des mesures faites, d'une part à la longuer d'onde 6IOmμ , d'autre par à la longueur d'onde 280 mμ , renseignent sur l'importance du complexe coloré bleu dans la céruloplasmine.

2) MICRO- DOSAGE .

Il existe plusieurs techniques de micro-dosage du cuivre dans du matériel biologique. Celle basée sur l'emploi du di-éthyl di-thio-carbamate a été utilisée par de nombreux auteurs. Cependant, depuis plusieurs années , on a trouvé certaines substances organiques formant avec le cuivre des complexes plus fortement colorés et c'est donc une technique plus récente, fondée sur l'emploi de l'oxalyldihydrazide que nous avons adoptée. La teneur totale en cuivre de la céruloplasmine peut être déterminée, quel que soit le degré d'oxydation de ce métal dans la protéine; cette technique est due à BEALE et CROFT (46).

I ml de solution protéique est additionné d'un même volume d'acide chlorydrique 2N et on laisse réagir pendant un temps suffisant, IO minutes en général, pour que le cuivre contenu dans la céruloplasmine soit libéré.

On précipite alors les protéines par addition d'acide trichloracétique à IO %. Après centrifugation, un volume de surnageant, additionné d'ammoniaque, est traité par un volume IO fois moindre d'oxalyldihydrazide et par de l'acétaldéhyde à raison de 3 volumes d'acétaldéhyde pour 2 volumes d'oxalyldihydrazide. Le mélange est maintenu en incubation à 60°C pendant IO minutes, temps pendant lequel se développe la coloration caractéristique.

A l'emploi d'une solution étalon faite à l'aide de sulfate de cuivre, préconisé par beaucoup d'auteurs, nous avons préféré celui d'une solution obtenue avec du cuivre métallique dissous en présence d'acide

nitrique. Une solution mère, contenant 500 mg par litre permet d'établir une gamme convenable.

Le taux de prtéine est détérminé à l'aide de la réaction du biuret et le résultat est exprimé en % par rapport à celui-ci.

Il est primordial d'utiliser, pour ce dosage, une verrerie parfaitement débarrassée de toutes traces de cuivre, par lavage au mélange sulfo-chromique et rinçage abondant à l'eau bidistillée. On utilisera uniquement de l'eau bidistillée pour les dilutions.

V- ETUDE DES PEPTIDES PAR ELECTROCHROMATOGRAPHIE APRES DIGESTION TRYPSIQUE DE LA PROTEINE PERFORMYLEE.

INGRAM (47) a élaboré en 1956, une technique d'étude des protéines consistant en une digestion trypsique de celles-ci, suivie de séparation bidimensionnelle des peptides, obtenue par électrochromatographie. Cette technique appelée aussi " finger printing" a été complétée par plusieurs auteurs tant par une performylation précédant la digestion enzymatique que par des colorations spécifiques des peptides obtenus.

La technique que nous avons adoptée comporte une performylation, que nous avons préférée à la dénaturation par la chaleur, celle-ci se révélant parfois insuffisante.

La protéine dissoute au préalable dans l'acide formique est traitée par de l'acide performique à une

température comprise entre 0° C et -5° C. A la fin de la réaction, la protéine est précipitée par addition d'acide trichloracétique et la précipité ainsi obtenu est lavé plusieurs fois avec successivement de l'acide trichloracétique, de l'alcool absolu et, enfin, de l'éther.

On procède alors à l'hydrolyse trypsique et les peptides ainsi obtenus sont séparés, d'une part par chromatographie (dans le solvant classique:butanol, acide acétique, eau), d'autre part par migration électrophorétique sous haut voltage en tampon pyridine de pH 3,6.

La révélation de l'électrochromatogramme est faite à l'aide de ninhydrine qui met en évidence l'ensemble des peptides.

On effectue d'autre part, des colorations spécifiques de certains peptides selon les méthodes décrites par EASLEY (48)

- examen du chromatogramme sous ultraviolet avant traitement: révélation de tryptophane
- réaction de la phénanthrènequinone qui produit, sous l'action de l'ultraviolet, une fluorescence blanc-bleuté pour l'arginine , et plus foncée pour la tryptophane.
- réaction de PAULY pour la tyrosine et l'histidine.

VI - DOSAGE DES HEXOSES, HEXOSAMINES, ACIDES SIALIQUES.

I) DOSAGE DES HEXOSES

Le dosage des hexoses a été conduit selon la méthode de DREYWOOD (49) par réaction de l'anthrone,

modifiée par SCOTT et MELVIN (50).

Elle utilise une solution d'anthrone à 2% dans l'acide sulfurique concentré que l'ont fait réagir sur la protéine afin d'obtenir une coloration bleue caractéristique lue dans un colorimètre à 625 mμ et comparée avec des solutions standard de galactose-mannose.

2) DOSAGE DES HEXOSAMINES

Le procédé employé est la méthode modifiée de ELSON et MORGAN (5I)

Son principe consiste à hydrolyser la protéine en présence d'acide chlorhydrique afin de libérer les hexosamines . L' hydrolysat est ensuite évaporé, en vue d'écarter l'acide, dissous dans de l'eau et additionné de réactif d'ERLICH (para-di-méthyl-amino-benzaldéhyde en milieu alcoolique, additionné d'acide chlorhydrique concentré) et on laisse se développer la coloration durant 35 minutes à 37°C. La lecture est faite sur un spectrophotomètre BECKMAN D.U. à 540 mμ par comparaison avec un "blanc" et une solution standard de glucosamine.

3) DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES

Les acides sialiques ont été dosés par la méthode de WARREN (52) à l'acide thio-barbiturique.

Après une hydrolyse en milieu acide sulfurique N/IO, la protéine est successivement attaquée par le métapériodate de sodium et l'arséniate de sodium avant d'être traitée par une solution d'acide thio-barbiturique à 0,6 % en milieu sulfate de sodium 5M. Une couleur rouge se développe, qui est extraite par le cyclohexanone. Après

cela,les lectures sont faites sur un spectrophotomètre BECKMAN D.U. en longeur d'onde 549mμ .

VII- ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE .

La technique utilisée est celle de GRABAR et BURTIN (4I).

Elle comporte deux étapes:

-une migration électrophorétique en gélose avec tampon véronal sodique 0,05M de pH 8,2 contenant IO % de glycérol et 0,I% de merseptyl, qui a pour but de séparer les différentes fractions protéiques.

- une diffusion, dans une direction perpendiculaire à celle de la migration électrophorétique d'un sérum animal anti-sérum total.

La rencontre de chaque antigène avec l'anticorps correspondant provoque une ligne de précipitation. Cette étude,éventuellement complétée par une deuxième expérience avec un anti-sérum spécifique, permet l'identification de chaque protéine.

VIII- DETERMINATION DES ACIDES AMINES TERMINAUX.

Le principe consiste à faire réagir la protéine avec le fluorodinitrobenzène (53;54) ou le dansylchlorure (55) de manière à substituer les groupes amino-libres, c'est à dire, le groupe N-terminal(ou les groupes N-terminaux) et les groupes ε amino de la lysine. Les acides aminés terminaux sont ensuite identifiés par chromatographie sur couche mince, en gel de silice, après une hydrolyse acide aboutissant à la rupture de toutes les liaisons peptidiques.

Nous avons adopté la technique originale de SANGER (53) dans laquelle la dinitrophénylation de la protéine s'effectue en milieu éthanolique à 5% le pH étant maintenu à 9 à l'aide de bicarbonate de sodium.Après plusieurs heures d'agitation à l'obscurité, le précipité centrifugé est lavé plusieurs fois à l'eau puis à l'alcool, et, enfin à l'éther. L'hydrolyse est effectuée en milieu acide chlorhydrique 6N et durant généralement 24 heures; et l'extrait éthéré est soumis à une chromatographie bidimensionnelle avec les solvants indiqués dans la technique de dansylation (55) , en vue de caractériser le, ou les acides aminés terminaux.

B -RESULTATS

I - ETUDE ELECTROPHORETIQUE

I) ACETATE DE CELLULOSE-

Les résultats obtenus, après migration électrophorétique sur acétate de cellulose, ont été révélés par l' amido- schwarz et photographiés (fig I -a à g.). Ils permettent de confronter, pour chaque espèce, la céruloplasmine isolée avec le plasma ou le sérum de l'espèce étudiée.

Alors que la céruloplasmine humaine deux fois cristallisée (fig I g) se présente sous forme d'une bande unique, ainsi que celles du cheval (fig I-a) et du mulet (fig I-b), nous constatons la présence de deux bandes chez les autres animaux. L'activité oxydasique est essentiellement localisée dans la bande la plus rapide en ce qui concerne le lapin et la chèvre alors qu'elle correspond à la bande lente chez la brebis et le babouin.

Notons qu'une coloration spécifique révélant la présence de métaux lourds (dont le cuivre) à l'aide de di-phényl-carbazone (56) s'est montrée positive

pour toutes les bandes, même celles dépourvues d'activité oxydasique.

Nous discuterons dans le chapitre IV de la signification de ces résultats .

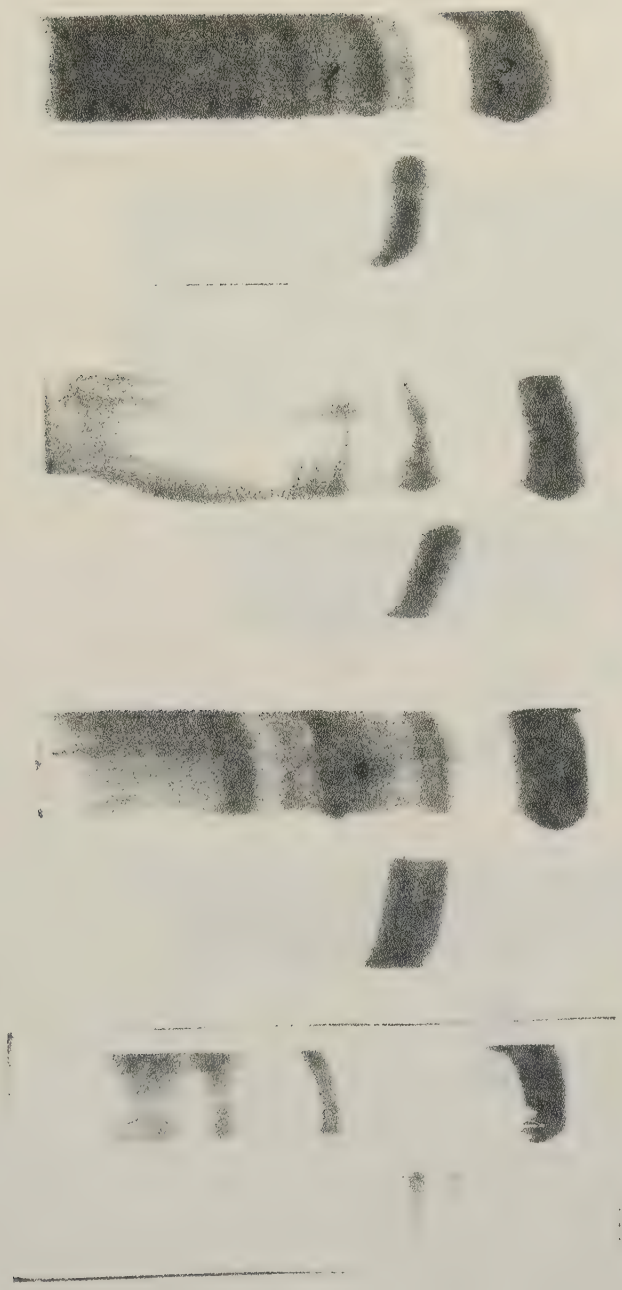


Fig I-a: CHEVAL

Fig I-b: MULET

Fig I-c: LAPIN

Fig I-d: CHEVRE

FIG I- migration électrophorétique sur acétate de cellulose: céruloplasmine isolée - (a) chez le cheval, (b) chez le mulet, (c), chez le lapin, (d)chez la chèvre- confrontée avec le plasma ou le sérum de l'espèce étudiée .

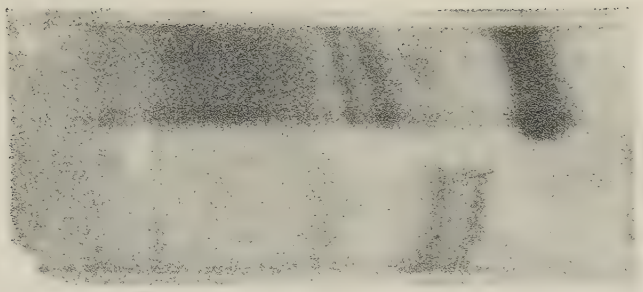


Fig I-e: BREBIS

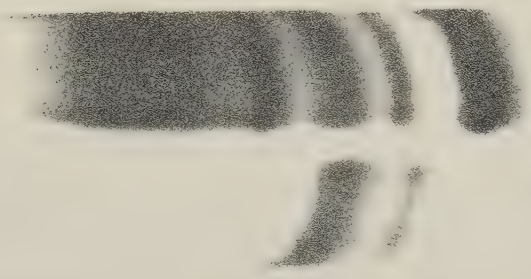


Fig I-f: BABOUIN

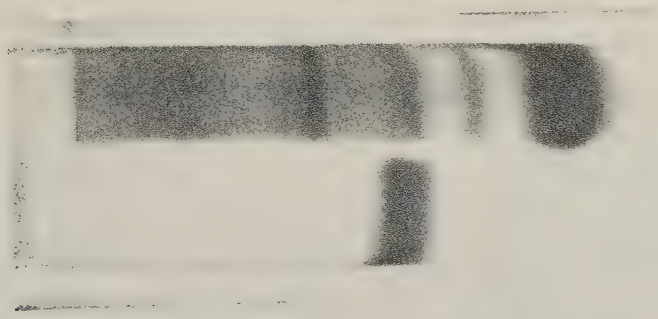


Fig I-g: HOMME

Fig I: (suite) Migration électrophorétique sur acétate de cellulose:
céruloplasmine isolée - (e) chez la brebis, (f) chez le babouin, (g) chez l'homme- confrontée avec le plasma ou le sérum de l'espèce étudiée.

2c) GEL D'AMIDON

Les électrophorèse en gel d'amidon (fig 2- a à g) ont été effectuées à l'aide de préparations de céruloplasmine contenant environ 5 g/l de protéine.

Chauqe céruloplasmine est comparée au plasma corr'spondant. Sur la partie gauche de l'image les protéines sont colorées à l'amido-schwarz, sur la partie droite la révélation de l'activité oxydasique est faite à l'aide de para- phénylène - diamine.

Tous les animaux montrent deux bandes, plus ou moins rapprochées, à l'amido-schwarz. La plus rapide est également la plus marquée et elle correspond à celle supportant l'activité oxydasique.

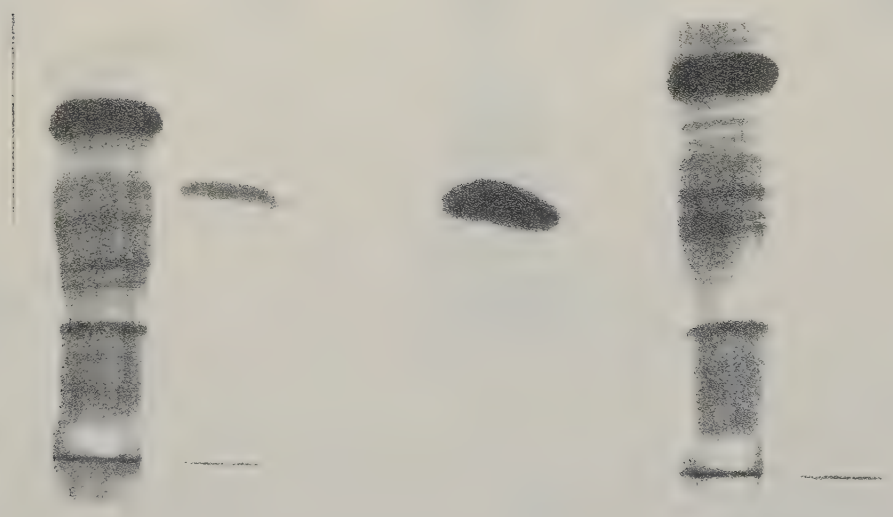


Fig 2 a: CHEVAL Fig 2b - MULET

Fig 2: Migration électrophorétique sur gel d'amidon. Céruloplasmine isolée - a) chez le cheval,b) chez le mulet- confrontée avec le plasma de l'espèce étudiée.

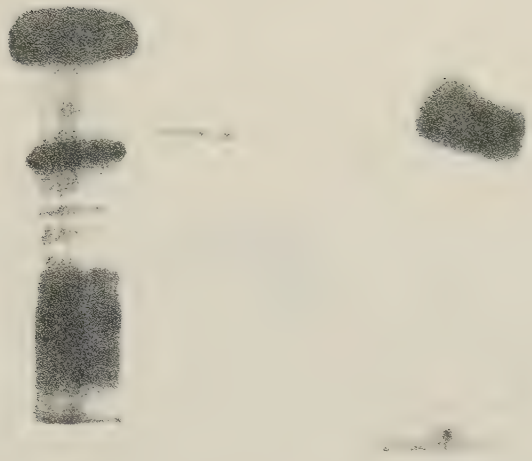


Fig 2 c- lapin

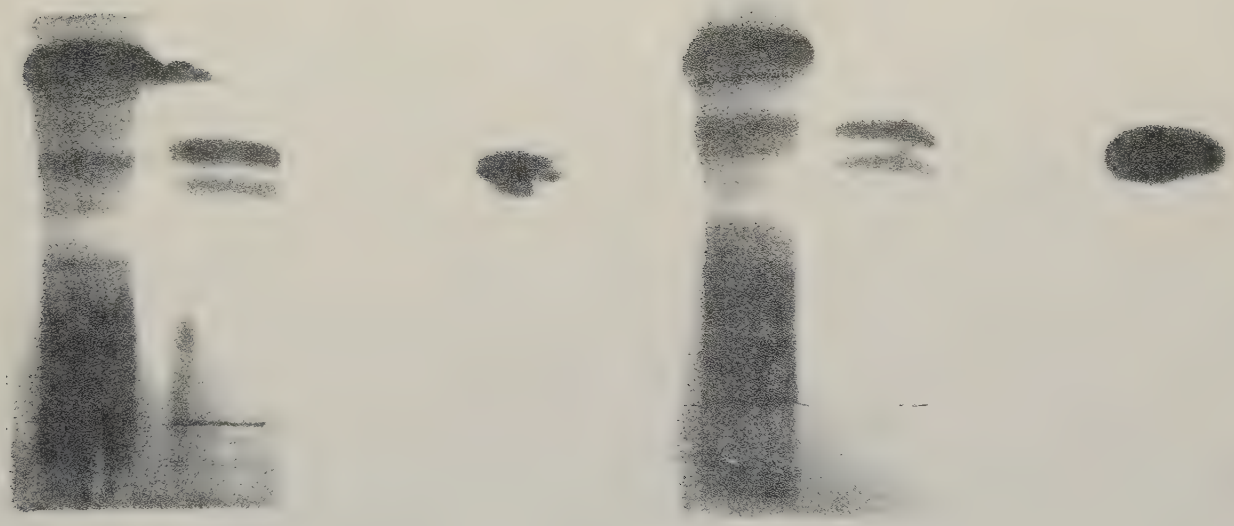


Fig 2-d : CHEVRE DFig 2-e : BREBIS

Fig 2 (suite): Migration électrophorétique sur gel d'amidon- ceruloplasmine isolée-chez le lapin, chez la chèvre chez la brebis - confrontée avec le plasma de l'espèce étudiée

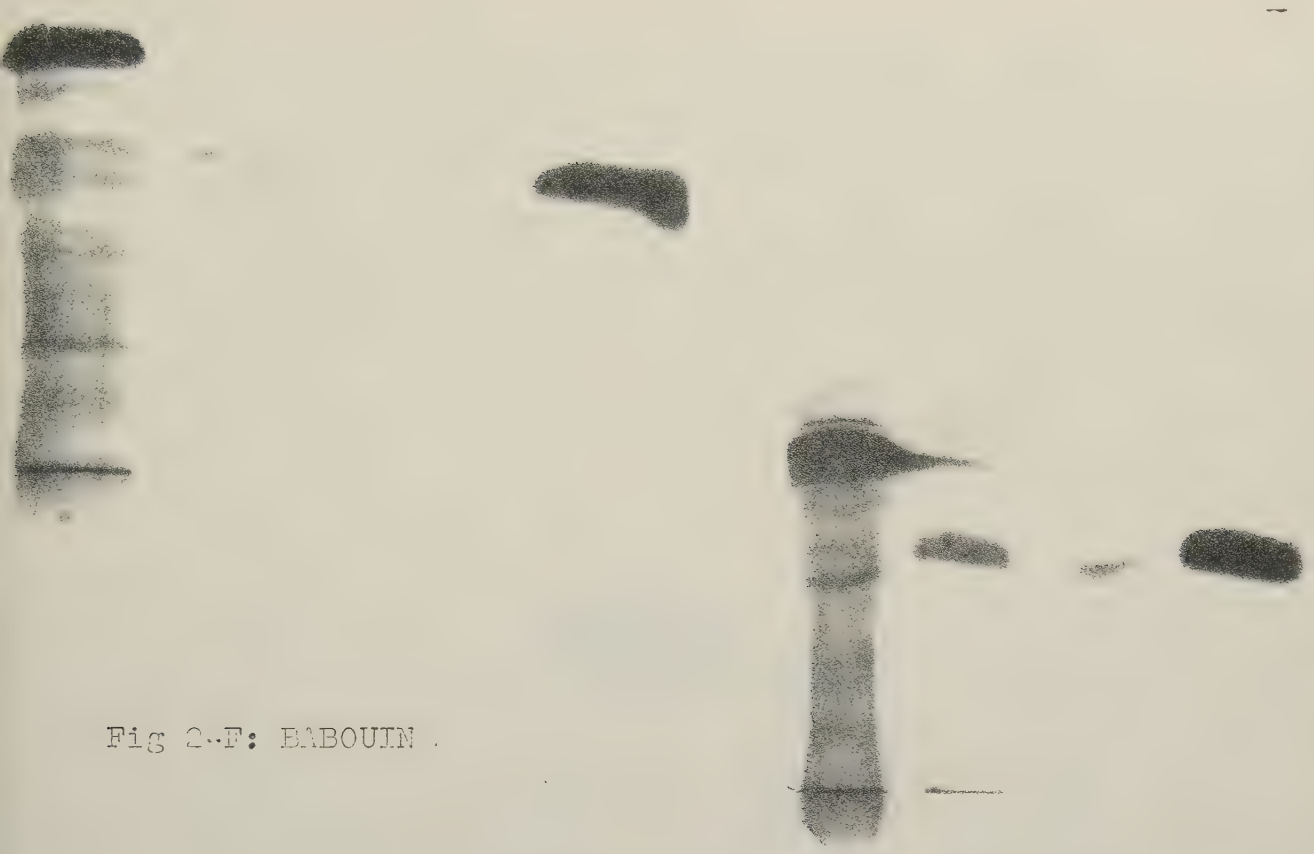


Fig 2-F: BABOUIN

Fig 2-g: HOMME

Fig 2 (suite) Migration électrophorétique sur gel d'amidon:
céruloplasmine isolée - (f) chez le babouin, (g) chez l'homme- confrontée avec le plasma de l'espèce étudiée

La figure 3 représente une étude sur f gel d'amidon d'une céruloplasmine de lapin isolée à partir d'un très petit volume de plasma, afin de pouvoir opérer dans les délais les plus courts. La technique employée, dans ce cas, est la micro technique de MOURAY et coll.(39). Elle nous a permis d'opérer plus rapidement et de monter ainsi que que les deux bandes révélées

par les migrations électrophorétiques précédentes (coloration à l'amido-schwarz) n'étaient pas dues à une dégradation de la céruloplasmine, ce qu'aurait pu laisser supposer la forte diminution (ou même l'absence) d'activité oxydasique à l'égard de la para-phénylène-diamine de l'une des deux bandes après la purification de la préparation.

Fig 3: Micro - technique sur gel d'amidon révélant sur une céruloplasmine de lapin les deux bandes de céruloplasmine à activité oxydasique très nettement positive.
Ce résultat est en accord avec les travaux publiés par BINETTE et coll. (27) en 1965.

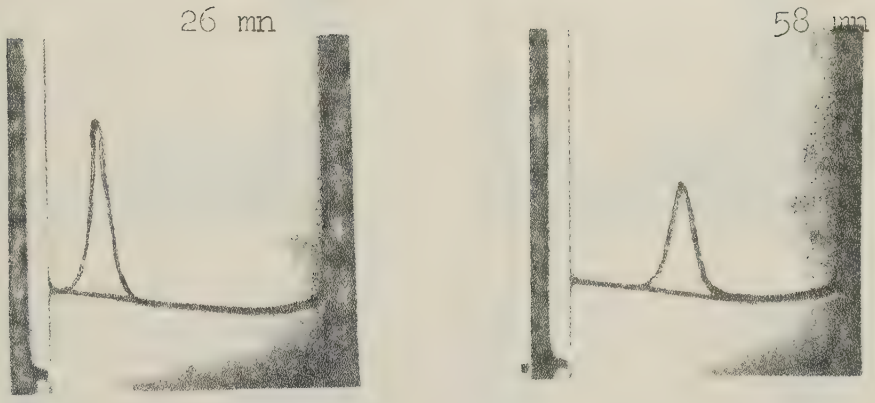


Fig 4-a:CHEVAL

Fig 4b:MULET

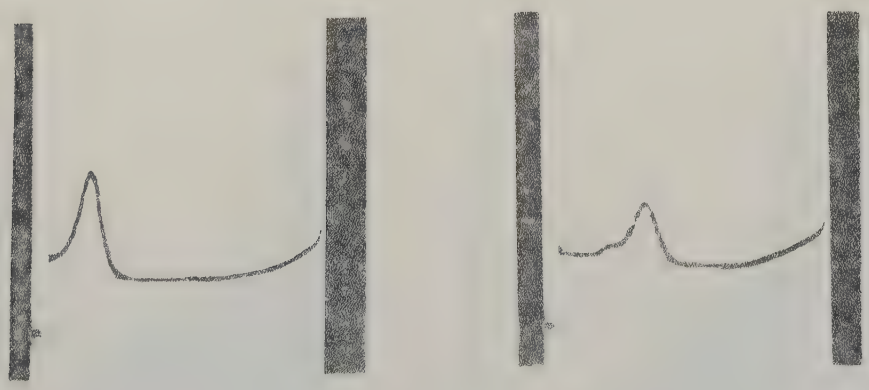


Fig 4c: LAPIN

Fig 4: Enregistrement des résultats de l'ultracentrifugation analytique à 26mn et à 58mn a) chez le cheval, b) chez le mulet, c) chez le lapin.

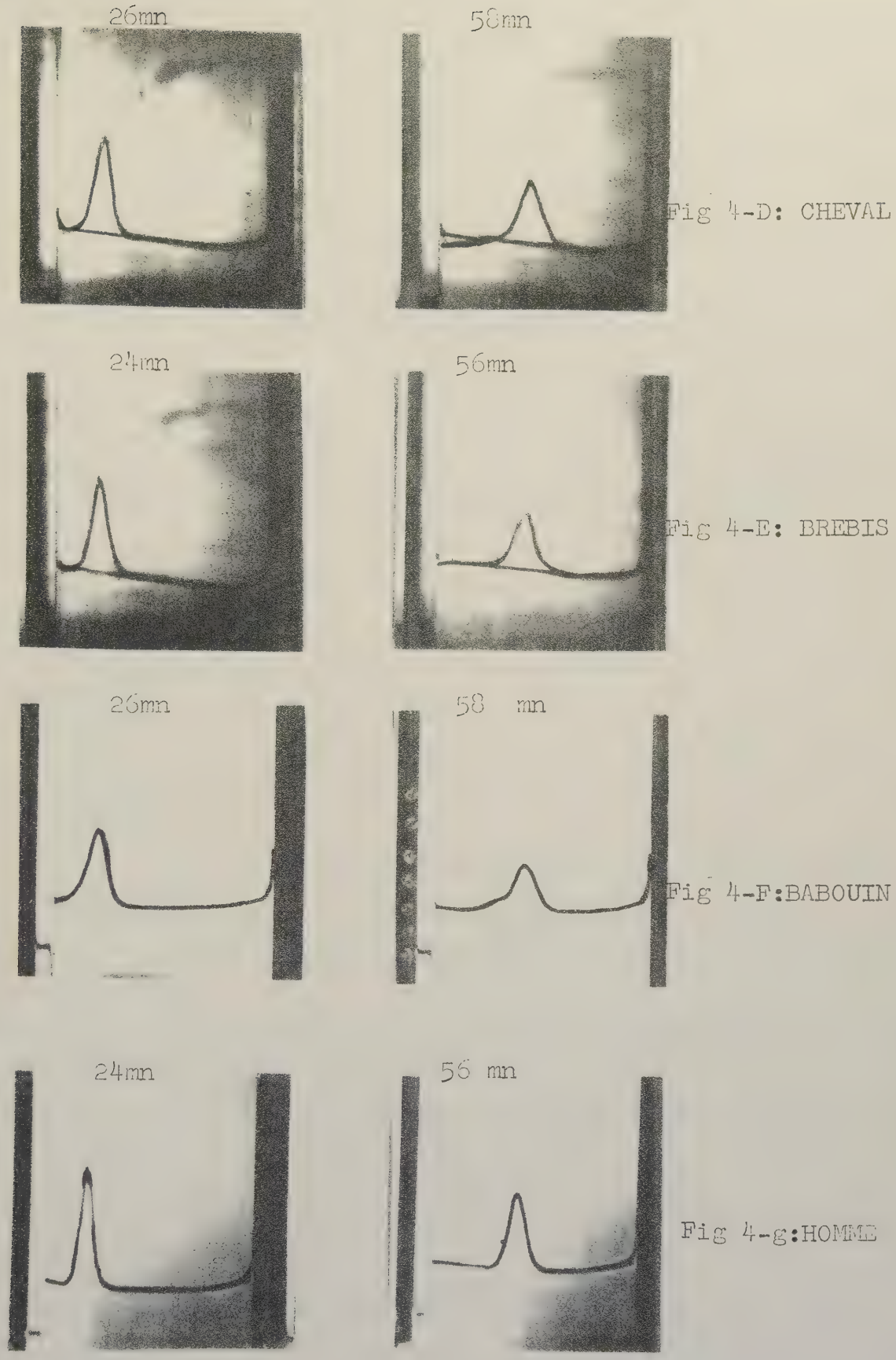


Fig 4:(suite): Enregistrement graphiques des résultats de l'ultra-centrifugation analytique à 26Mn et 58mn-d- chez la chèvre et le babouin, et à 24mn et 56mn-e-g: chez la brebis et l'homme

TABLEAU I

VITESSE DE SEDIMENTATION

CERULOPLASMINE	Vitesse de sédimentation en unité Svedberg	Pourcentage du cinstituant principal
CHEVAL	6	96
MULET	5	88
LAPIN	4	85
CHEVRE	6	I00
BREBIS	6	95
BABOUIN	5	87
HOMME	5	I00

Les coéfficients de sédimentation rapportés dans le Tableau I n'ont qu'une valeur relative, car chaque préparation n'a subi qu'une seule analyse et les chiffres ne se sont donc pas extrapolés.

La présence d'un seul pic important, sur le graphique d'enregistrement, témoigne de l'existence d'un seul constituant principal.

Il est à noter que dans le cas du lapin (fig 4c) la présence d'un second constituant en proportion non négligeable. On avait d'ailleurs pu remarquer que la courbe d'enregistrement sur L.K.B. (fig 8; p. 39) ne présentait pas un pic net, révélant ainsi un mélange de deux constituants de poids moléculaires très voisins. Les migrations électrophorétiques, accompagnées de colorations spécifiques, ont montré qu'il s'agit de deux degrés d'oxydation de la céruloplasmine.

III - DOSAGE ENZYMATIQUE

Dans le tableau ci-dessous sont consignées les activités enzymatiques des plasmas ou sérums des différentes espèces étudiées.

TABLEAU I

PLASMA (protéines:5%)	pH 5,3	pH 6
	Activité en unités par mg de protéines	Activité en unités par mg de protéines
CHEVAL	27,4	49,0
MULET	30,0	54,0
LAPIN	39,2	48,0
CHEVRE	32,4	42,0
BREBIS	22,8	28,8
BABOUIN	92,0	183,0
HOMME	34,0	48,0
SERUM		
CHEVAL	47,6	65,0
HOMME	60,0	64,0

Pour le cheval et l'homme on a pu étudier l'activité oxydasique du sérum qui est plus élevée que dans le plasma correspondant à la même concentration protéique. Cette différence s'explique par la présence de citrate dans le plasma. Le sang étant prélevé sur ACD. Or cet anion est un inhibiteur bien connu de la céruloplasmine. Comme nous n'avons pu opérer, en général , que sur du plasma, nos résultats n'ont qu'une valeur comparative.

Le résultat concernant le babouin est sujet à caution car le plasma avait été au préalable traité par l'oxygène (Voir Chap.II) afin de stabiliser le cuivre de la céruloplasmine.

Les valeurs numériques données par HENRY et coll. (43) sont, pour le sérum, compris entre 2 800 et 5 700 unités par ml, soit 40 et 81,4 unités par mg de protéines. Nos résultats sont donc en accord avec ces valeurs.

Le Tableau II récapitule les activités enzymatiques observées dans nos différentes préparations de céruloplasmine.

TABLEAU II

(activité enzymatique de la céruloplasmine)

CERULOPLASMINE	p H 5,8	p H 6
	Activité en unités par mg de protéine	Activité en unités par mg de protéine
CHEVAL	4 000	7 240
MULET	2 440	3 200
LAPIN	II 200	I2 600
CHEVRE	I 900	4 500
BREBIS	I 820	5 000
BABOUIN	8 400	I6 500
HOMME	I9 I00	2I 200

CERULOPLASMINE	Influence de la conservation sur l'activité oxydasique des préparations de céruloplasmine	
CHEVAL ♀	2 I40	3 760
BABOUIN ♀♀	6 000	7 800
HOMME ♀♀♀	I0 600	I8 000

♀ = congelé depuis II mois
♀♀= congelé depuis 3 mois
♀♀♀ = conservée à + 4° C depuis I mois

La céruloplasmine humaine présente la plus forte activité suivie par le babouin puis le lapin.

Cependant les préparations provenant du mulet, de la chèvre et de la brebis n'ont été étudiées qu'après un certain délai de conservation et nous voyons dans la partie inférieure du tableau, que la conservation même à - 60 ° C, est préjudiciable au maintien intégral de l'activité oxydasique . La perte d'activité oxydasi- est parallèle à la perte de couleur observée après conservation. Certaines de céruloplasmines animales paraissent plus fragiles, lors de la conservation à -60°C, que la céruloplasmine humaine. Cette dernière est peu affectée par la congélation.

Toutefois cette labiliré est à rapprocher de celle qu'on observe lors de la lyophilisation d'une céruloplamsine. En effet la poudre bleue, même conservée à froid, se décolore lentement et après une période de IO à I2 mois, il ne reste qu'une poudre blanchâtre ne possédant plus ni cuivre chromophore, ni activité oxydasique.

Dans le cas du cheval, puisque nous avons pu déterminér l'activité oxydasique du sérum, il nous est possible de calculer la teneur en céruloplasmine de cet échantillon à partir de la connaissance du taux de protéines de la solution utilisée:

$$x = I\,000 \frac{a_I \times n}{a_2 \times n'}$$

x= mg de cuivre par litre
a_I= activité oxydasique dans le sérum
a_2= activité oxydasique de la céruloplasmine
n = taux réel de protéines du sérum
n'= taux de protéines de la solution utilisée

Ce qui donne pour le cheval: 630 mg/ I

IV - TENEUR EN CUIVRE

RAPPORT $E^{I\%}_{Icm}$ à 6I0 mμ / $E^{I\%}_{Icm}$ à 280 mμ .

TABLEAU I

CERULOPLASMINE	Absorption à 6I0mμ			Absorp. à 280mμ	$E^{I\%}_{Icm}$ à 6I0 / $E^{I\%}_{Icm}$ à 280
	$E^{I\%}_{Icm}$	Cuivre μg/ml	$E^{\mu g/ml}_{Icm}$	$E^{I\%}_{Icm}$	
CHEVAL	0,77	2,4	0,032	I5,2	0,05I
MULET	0,39	I,8	0,022	I5,4	0,025
LAPIN a	0,42	2,0	0,02I	I5,4	0,027
LAPIN b	0,62	2,2	0,028	I5,4	0,040
CHEVRE	0,5I	I,8	0,028	I5,0	0,034
BREBIS	0,49	2,4	0,020	I4,6	0,034
BABOUIN	0,32	2,0	0,0I6	I5,0	0,02I
HOMME après crist.	0,72	2,8	0,026	I5,4	0,047
HOMME après gel-fil.	0,68	2,8	0,024	I5,4	0,044

Lapin : (a) = bande lente
(b) = bande rapide

TABLEAU II

(Influence de la conservation)

CERULOPLASMINE	Absorption à 610mμ			Absorption à 280 mμ	$E_{1cm}^{1\%}$ à 610mμ / $E_{1cm}^{1\%}$ à 280mμ
	$E_{1cm}^{1\%}$	Cuivre µg/ml	E_{1cm}^{1} µg/ml	$E_{1cm}^{1\%}$	
CHEVAL	0,55	2,4	0,025	15,2	0,036
BABOUIN	0,18	2,1	0,009	15,0	0,012
HOMME	0,54	2,8	0,019	15,2	0,036

L'absorption à 610 mμ correspond à la couleur bleue spécifique de la céruloplasmine. Un rapport d'absorption maximum de 0,048 a été décrit pour les préparations de céruloplasmine humaine les plus pures (SCHEINBERG: 5) mais le nombre d'atômes de cuivre responsables de l'intensité de la couleur bleue varie selon les auteurs, et ne correspondrait qu'à 2 ou 3 atomes , selon les données les plus récentes.

On a donné quelques valeurs numériques relatives à des céruloplasmines conservées par congélation, qui montre la diminution très nette de la proportion de cuivre chromophore. ce résultat est à rapprocher de la perte d'activité oxydasique des préparations conservées.

Néammoins, c'est pour la céruloplasmine de cheval que nous avons relevé la teneur en cuivre chromophore la plus élevée, alors que cette céruloplasmine n'a montré qu'une activité oxydasique moyenne.

Cela nous amènerait à conclure que la comparaison entre les proportions de cuivre chromophore dans les céruloplasmines des différentes espèces ne peut permettre de prévoir une comparaison entre leurs activités oxydasiques.

DOSAGE DU CUIVRE

TABLEAU III

(teneur en cuivre du plasma)

PLASMA	µg de cuivre par mg de protéines
CHEVAL	0,0280
MULET	0,0170
LAPIN	0,0160
CHEVRE	0,0164
BREBIS	0,0190
BABOUIN	0,0220
HOMME	0,0150

TABLEAU IV

(teneur en cuivre de la céruloplasmine)

CERULOPLASMINE	µg de cuivre par mg de protéine	CUIVRE %
CHEVAL	2,37	0,24
MULET	I,80	0,I8
LAPIN (a)	2,00	0,20
LAPIN (b)	2,20	0,22
CHEVRE	I,78	0,I8
BREBIS	2,38	0,24
BABOUIN	2,00	0,20
HOMME après crist.	2,82	0,28
HOMME après gel-fil.	2,80	0,28

Lapin : (a) = bande lente
(b) = bande rapide

En ce qui concerne la teneur en cuivre du plasma, le cheval présente le taux le plus élevé, suivi par le babouin, alors que l'homme est en bas de l'échelle. Notons que le chiffre trouvé pour ce dernier correspond à la moyenne généralement admise de II0 µg, pour I00ml de sérum à 7% , soit : 0,0I57 µg par mg de protéines.

Notons que ces résultats sont à opposer à ceux trouvés pour les céruloplasmines purifiées qui donnent, au contraire, le pourcentage de cuivre le plus élevé chez l'homme, suivi par le cheval et la brebis.

Deux chiffres sont indiqués pour le lapin car, pour cet animal, on a pu séparer les deux types de céruloplasmine correspondant aux bandes électrophorétiques, par gel-filtration.

Afin de compléter l'étude des 2 types de céruloplasmine de lapin amorcée dans le Chapitre III (p. 69), on a mesuré la teneur en cuivre et le rapport d'absorption à 6I0 mµ et 280 mµ sur les 2 fractions séparées grossièrement par simple chromatographie. Alors qu'on a obtenu des teneurs en cuivre tout à fait comparables pour les 2 fractions (fraction rapide: 0,08%; fraction lente: 0,09%), le rapport d'adsorption à 6I0 mµ et 280 mµ est beaucoup plus fort pour la fraction rapide (0,022) que pour la fraction lente (0,0I3). Ces expériences confirment l'existence de 2 types de céruloplasmine de teneurs différentes en cuivre chromophore. Le fait d'avoir opéré sur un produits brut explique un pourcentage de cuivre beaucoip plus faible que sur lz produit purifié.

V.-FINGER PRINTINGS

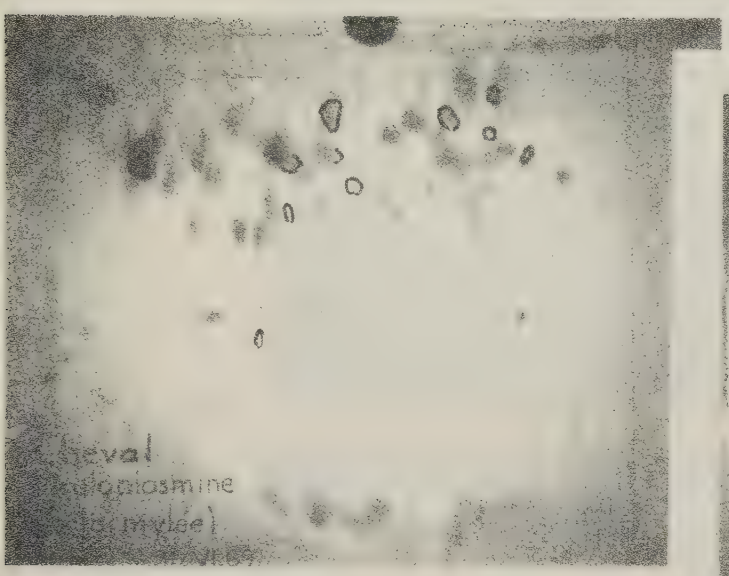


Fig 5-a: CHEVAL

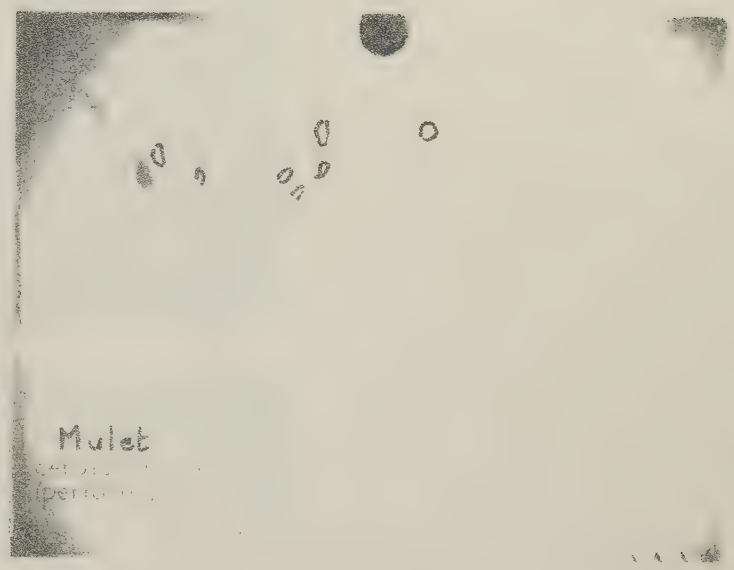


Fig 5-b: MULET

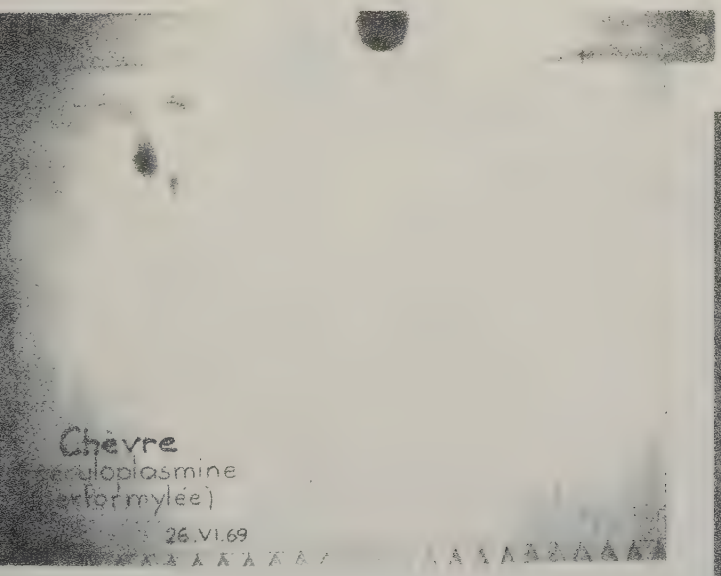


Fig 5 c: CHEVRE

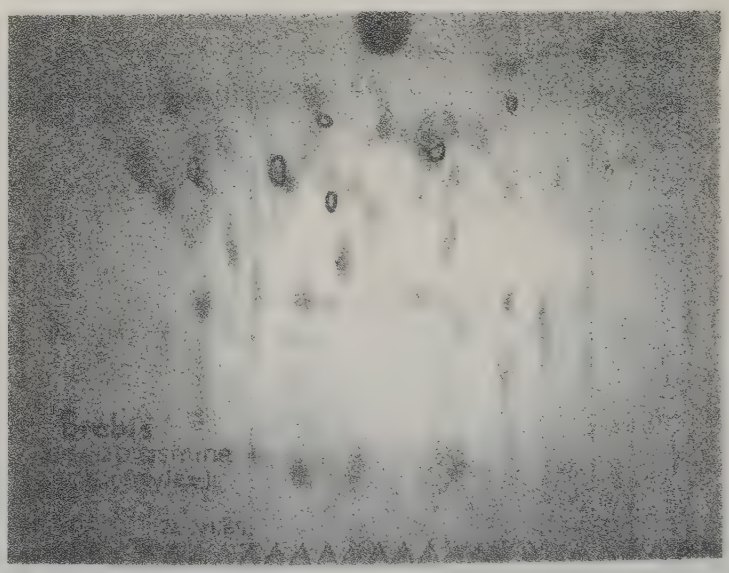


Fig 5-d: BREBIS

FINGER PRINTINGS (suite)

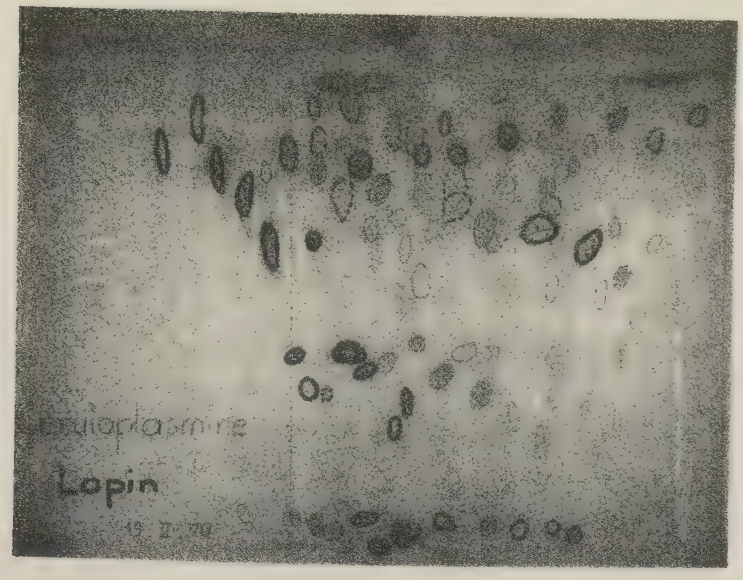


Fig 5-e:LAPIN

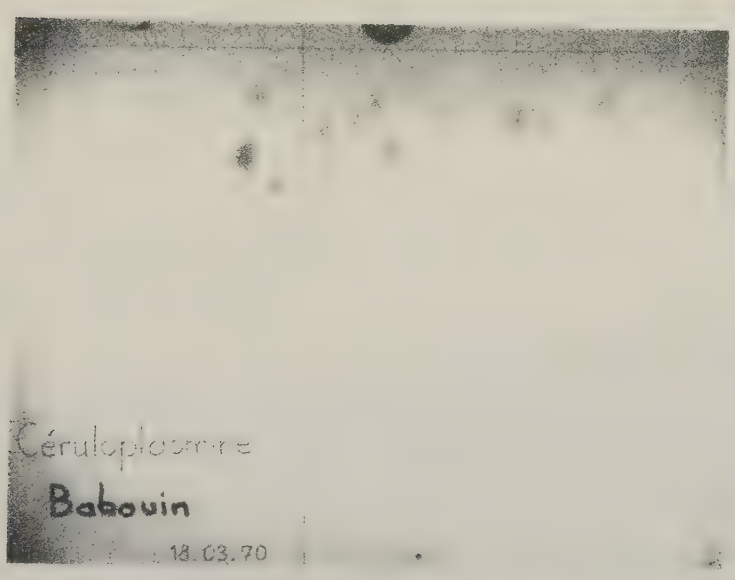


Fig 5-f:BABOUIN

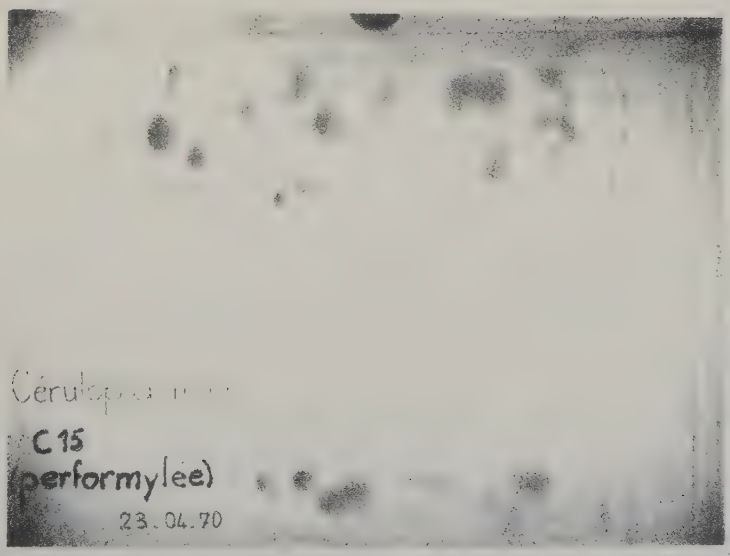


Fig 5-g:HOMME

Le poids moléculaire relativement élevé de la céruloplasmine explique le grand nombre de peptides observés pendant la digestion peptidique de la protéine préalablement performylée.

Nous avons ainsi dénombré 5I peptides chez l'homme (fig.5g) et le babouin (fig 5 -f), 54 chez le cheval (fig 5 -a), 59 chez le lapin (fig 5-E), 6I chez la brebis (fig 5-d) et 63 chez la chèvre (fig5c).

Alors que la disposition de certains peptides se répète d'une espèce dans l'autre, un assez grand nombre d'entre eux montrent des emplacements différents selon l'animal étudié.

Nous remarquons cependant une grande ressemblance entre le cheval et le mulet, d'une part; la chèvre et la brebis , d'autre part.

C'est la céruloplasmine du lapin qui montre la plus faible ressemblance avec celles des autres animaux étudiés.

Les différences sont encore plus accusées lorsqu'on examine les résultats obtenus avec le réactif de PAULY. Cette réaction révèle,par une coloration rouge (rosée) l'histidine et, par une teinte jaune, la tyrosine. On trouve chez l'homme seulementII peptides histidino-positifs alors que le cheval en possède I5, la chèvre I6 , la brebis 20, le babouin 23 et le lapin 29. Pour la tyrosine, on ne relève que 3 peptides positifs chez le lapin, 5 chez l'homme, le cheval et le babouin, 7 chez la brebis et 8 chez la chèvre.

La réaction à la phénanthrène-quinose permet de visualiser et le trytophane , et l'arginine.

Nous avons constaté des variations importantes car nous avons trouvé que 22 peptides positifs pour l'arginine chez le babouin, 35 chez la chèvre, 45 chez le lapin, 48 chez l'homme, 49 chez le cheval et 5I chez la brebis. Pour le tryptophane nous avons dénombré que 5 peptides chez l'homme et le cheval, et aucun chez les autres animaux. Notons que la céruloplasmine humaine possède 45résidus d'arginine selon HEIMBURGER et coll. (57), et 20 résidus de trytophane. La protéine est d'ailleurs très riche en tyrosine et trytophane comme le montre son coefficient d'extinction à 280 mμ

VI - HEXOSES, HEXOSAMINES , ACIDES SIALIQUES

TABLEAU I

CERULOPLASMINE	HEXOSES %	HEXOSAMINES %	ACIDES SIALIQUES %
CHEVAL	3,6	3,7	2,6
MULET	4,2	3,0	I,8
LAPIN °°°°	5,0	3,I	I,5
CHEVRE	5,9	2,9	3,3
BREBIS	2,9	2,8	2,5
BABOUIN	3,5	3,0	2,4
HOMME	3,6	3,5	2,9

On peut remarquer la presqu'identité des résultats obtenus pour les ceruloplasmines de cheval, de babouin et d'homme; et la grande similitude générale observée entre toutes les céruloplasmines en ce qui concerne la composition en glucides, aussi bien pour les hexoses, les hexosamines et les acides sialiques.

VII-ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

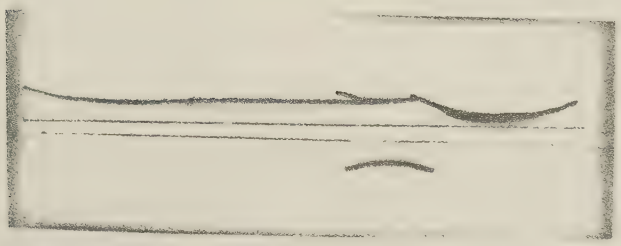


Fig 6-a:CHEVAL

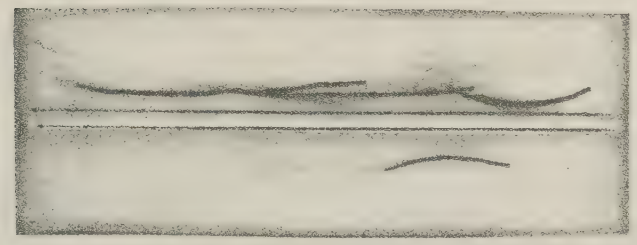


Fig 6-b:MULET

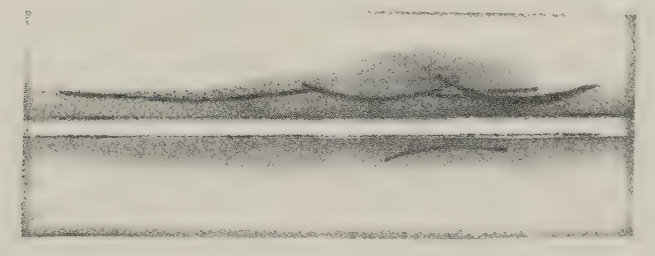


Fig 6-c:BREBIS

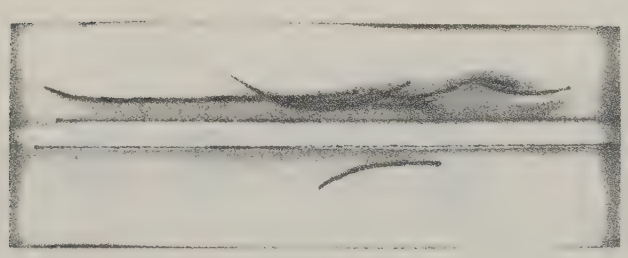


Fig 6-d: BABOUIN

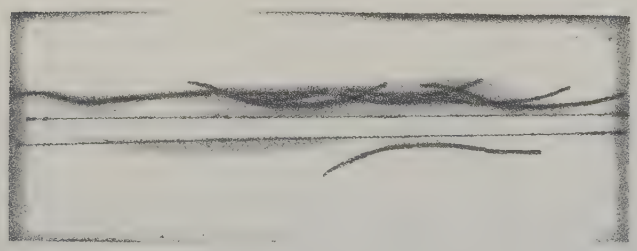


Fig6-e:HOMME

Fig 6-a à e: Immunoélectrophorèses de céruloplasmines

Nous n'avons pu obtenir une image correcte en ce qui concerne les céruloplasmines de chèvre et de lapin, car les différents anti-sérums commerciaux anti-chèvre et anti-lapin que nous avons essayés successivement étaient incomplets en tant qu'anti-corps, et ne nous ont pas donné une réaction suffisante. Nous les avons préparés nous-mêmes sans amélioration suffisante.

Nous avons rencontré la même difficulté pour l'anti-sérum de babouin et nous avons employé à sa place un anti-sérum humain.

Cependant alors qu'un anti-sérum anti-céruloplasmine humaine ne réagissait pas en dehors du babouin, les gamma-globulines préparées à partir de cet anti- sérum, et concentrées cinq fois par rapport à leur concentration naturelle, nous ont permis de révéler les céruloplasmines du babouin, du cheval, du mulet, de la chèvre , de la brebis démontrant ainsi que ces céruloplasmines possèdent des motifs communs et montrent donc une identité partielle.(fig7)

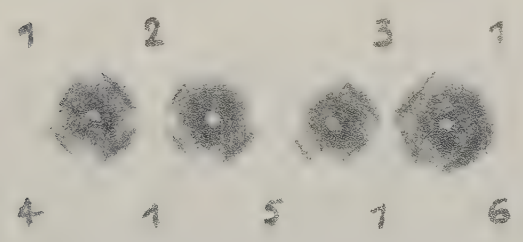


Fig 7. Immuno-diffusion sur gélose en tampon véronal de pH 8,2
- au centre, γ- globulines (concentrées 5 fois) d'un anti-sérum de lapin anti-céruloplasmine humaine
- à l'extérieur, céruloplasmine: en I-de cheval, en 2-de babouin, en 3- d'homme, en 4- de mulet, en 5- de chevre en 6- de brebis.

VIII - DETERMINATION DES ACIDES AMINES TERMINAUX

Nous avons opéré d'abord sur la céruloplasmine humaine pour laquelle nous disposions de matière première en abondance. Nous avons trouvé, comme acides aminés N-terminaux, dans l'extrait éthéré: la valine, et dans la phase aqueuse: la lysine.

Ceci est en accord avec les résultats publiés en I963 par KASPER et DEUTSCH (38) alors SCHULTZE et MAHLING (58) en I96I, avaient signalé la présence de valine, acide aspartique et sérine.

Des essais effectués sur nos échantillons de céruloplasmine de cheval et de babouin nous ont montré la présence des acides aminés N-terminaux suivants:

- acide aspartique et sérine pour le cheval
- acide glutanique et tyrosine pour le babouin.

Malheureusement, nous n'avons pas pu opérer sur d'autres céruloplasmines animales; en effet, pour obtenir des résultats concluants, il nous aurait fallu multiplier les expériences, or nous manquions de matière première.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Avant d'aborder les résultats obtenus pour les différents animaux, il convient d'examiner les propriétés de la céruloplasmine humaine isolée par la technique à l'acide caprylique et de les comparer à celles d'autres préparations obtenues à l'aide de méthodes différentes.

Nous constatons tout d'abord que la céruloplasmine humaine ainsi purifiée est facilement cristallisable, qu'elle montre un seul composant à l'électrophorèse en acétate de cellulose , en gel d'amidon et en immunoélectrophorèse, ainsi qu'en ultracentrifugation, que sa teneur en cuivre (0,28%) et le rapport d'absorption (0,044- 0,047) correspondent aux données de la littérature. Cette technique donne donc des résultats tout à fait satisfaisants dans le cas de la céruloplasmine humaine.

La même technique, avec toutefois de légères variations pour certains d'entre eux, a permis d'obtenir, chez tous les animaux examinés, des céruloplasmines purifiées permettant l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. Nous avons constaté, tout d'abord, que ces céruloplasmines animales sont plus fragiles que la céruloplasmine humaine et notamment en ce qui concerne la stabilité du complexe Cu/protéine.

En effet, nous n'avons pu cristalliser nos céruloplasmines, ni dans les conditions habituelles ni en faisant varier le pH et la force ionique, ni en présence de sulfate d'ammonium , technique recommandée par exemple OSAKI, KAYA et coll. (24) pour la céruloplasmine de porc; au cours des expériences les céruloplasmines se sont rapidement décolorées et des précipités blancs d'apocéruloplasmine se sont formés. A la suite de cet échec, on a eu recours à la gel-filtration sur G I00 afin de séparer les dernières impuretés(orosomucoïde et préalbumine) dont le poids moléculaire est très inférieur à celui de la céruloplasmine. L'expérience analogue, effectuée sur la céruloplasmine humaine nous a montre que le degré de pureté de cette préparation est en tous points comparables à la céruloplasmine purifiée par cristallisation.

Si ce procédé nous a permis de séparer les céruloplasmines animales d'avec les impuretés de poids moléculaire inférieur,les préparations obtenues ne répondaient pas toujours aux critères d'homogénéité.

Cette constatation concerne surtaut l'homogénéité électrophorétique, car seules les céruloplasmines de cheval et de mulet se présentent sous forme d'une bande unique. Les autre céruloplasmines montrent deux bandes plus ou moins rapprochées.Le problème se pose de savoir s'il s'agit là d'une variété existant in vivo ou d'un artéfact créé en cours de purification. En effet, le test oxydasique n'a pas permis de visualiser avec certitudes deux bandes dans le plasma correspondant Cependant de nombreux auteurs ont envisagé la possibilité de l'existence de plusieurs variantes de céruloplasmine même en ce qui concerne le plasma humain -(59), dont certaines seraient incolores, ne contiendraient

que peu de cuivre (Ià 6 atomes de cuivre selon les auteurs) et seraient dépourvues d'activité oxydasique . Par la suite l'existence de ces céruloplasmines pauvres en cuivre ou dépourvues de cuivre a été remise en question. En effet, ces résultats avaient été obtenus par chromatographie sur phosphate tricalcique (I3) (I5) mais DEUTSCH et FISHER (I8) ont, par la suite, démontré que cet adsorbant provoque des modifications moléculaires de la céruloplasmine et l'apparition de variantes électrophorétiques plus rapides. KASPER et DEUTSCH (38) ont fait des observations analogues, quant à l'effet de certains tampons, comme le tampon tris (tris-hydroxyméthyl-amino-méthane), sur la céruloplasmine humaine et, dans le cas de l'érythrocupréine (cuproprotéine des erythrocytes présentant certaines analogies avec la céruloplasmine); on a pu provoquer une hétérogénéité électrophorétique par simple gel-filtration sur G 75.

L'ensemble des observations faites, notamment par DEUTSCH et coll. (I8), pour les céruloplasmines humaines, obtenues sans l'action du mélange alcool-chloroforme, démontre la grande labilité de cette protéine. L'hétérogénéité électrophorétique de certaines de nos préparations pouvait être due, soit à la création d'artéfacts, lors du procédé de purification, soit à la persistance d'un contaminant. Nous avons rapidement écarté cette dernière hypothèse, car nous avons observé que l'activité oxydasique est présente dans les deux bandes chez le lapin, et, dans ce cas, nous avons pu séparer par gel-filtration les deux types de céruloplasmine qui se sont révélés contenir tous deux du cuivre.

Pour le babouin, nous avons pu tirer avantage de sa parenté immunologique avec l'homme. Des gamma-globulines préparées à partir d'un anti-sérum anti-céruloplasmine humaine ont donné un " ring-test" positif avec des éluats obtenus à partir de chacune des deux bandes séparées au préalable par électrophorèse sur acétate de cellulose, démontrant ainsi la parenté immunochimique des deux protéines.

Par ailleurs, nous ne pensons pas non plus que ces deux bandes soient le résultat d'un artéfact. En effet, CARRICO et coll. (31) viennent d'établir l'existence d'un composant appelé " apoceruloplasmin like" dans le plasma humain à l'aide d'une technique immunochimique. Ce composant pauvre en cuivre, existerait à l'état normal dans le plasma humain et correspondrait à environ 10 à 20 %de la totalité de la céruloplasmine.. Nous pensons que le plasma de certaines espèces animales étudiées par nous contient une proportion plus importante d'une telle variante de céruloplasmine. En dehors de variantes moléculaires contenant plus ou moins de céruloplasmine, on a observé,dans le sérum humain,l'existence de céruloplasmines oxydase-positives mais différant par leurs mobilités électrophorétiques. Ces variantes correspondent à un groupe sérique (SHREFFLER: 59) et des phénomènes analogues peuvent également exister chez l'animal.

Toutefois, il convient de rappeler que les auteurs utilisant une technique de purification basée sur l'emploi du mélange éthanol-chloroforme n'envisagant l'existence que d'une seule espèce moléculaire de la céruloplasmine. C'est en effet le cas de SCHEINBERG et coLL. (.6) pour la céruloplasmine humaine, de MORELL et coll. (26) pour la céruloplasmine de lapin, des auteurs japonais (23, 24) en ce qui concerne la céruloplasmine de porc. Cependant la cérumoplasmine, obtenue dans des conditions exceptionnellement altérantes pour l'ensemble de protéine, pourrait ne représenter qu'une sélection et lesvariétés moléculaires contenant moins de cuivre, se trouver ainsi éliminées. Nous rappellerons dans ce contexte l'exemple du plas-

minogène purifié selon la technique dite de " Kline" (32) qui comporte une dénaturation des protéines accompagnantes à pH II. Or le plasminogène ainsi purifié présentait des propriétés enzymatiques excellentes, mais des études plus récentes ont montré que la molécule était physico-chimiquement modifiée par rapport au plaminogène natif. Ces modifications concernent entre autres, le poids moléculaire. La solubilité, la mobilité électrophorétique . Il semble bien que le traitement alcool-chloroforme ait un effet sélectif. En effet, nous avons vérifié, dans le cas de la céruloplasmine de lapin où la préparation comportait deux variantes de mobilités électrophorétiques différentes, que le traitement par le mélange alcool-chloroforme ne laisse subsister qu'une seule variante dont les propriétés physico-chimiques diffèrent de celles du mélange des deux variantes.

L'ultracentrifugation analytique nous a surtout apporté un élément d'appréciation de l'homogénéité des préparations. Les coefficients de sédimentation obtenus n'ont qu'une valeur relative étant donné qu'une seule analyse a été effectuée pour chaque préparation étudiée à une seule concentration protéique (0,6 %).

Nous avons observé, en ce qui concerne l'activité oxydasique de nos préparations, des variations assez importantes d'une espèce à l'autre. Cependant, il convient de dégager différents facteurs pouvant avoir une influence sur l'activité oxydasique de la céruloplasmine. Le rôle du pH est important et, en ce qui concerne l'activité oxydasique de la céruloplasmine humaine, le pH 6 serait optimal (HENRY 43) mais l'activité maximale se trouverait déplacée dans certaines espèces animales. Nous avons choisi à titre comparatif,

E R R A T U M

A l'alinéa page IOI: " Il est difficile d'évaluer " jusqu'à "teneur en cuivre"- début page I02 - lire le passage suivant.

" Il est difficile d'évaluer l'amplitude exacte des différences d'activité que nous avons observées, en raison de l'influence de la conservation sur l'intégrité moléculaire de la céruloplasmine et plus particulièrement le rapport $Cu2^{+}$ / Cu^{+}. Toutefois, dans les conditions de notre expérience, la céruloplasmine humaine semble de beaucoup la plus active.

Nous constatons de même des différences assez importantes parmi les céruloplasmines animales en ce qui concerne deux autres caractères physico-chimiques: le rapport d'absorption $E^{I\%}_{Icm}$ à 6I0 mμ / $E^{I\%}_{Icm}$ à 280 mμ et la teneur en cuivre ..."

un seul pH supplémentaire alors que certains auteurs (BINGLEY et DICK ; 44) préconisent un pH plus élevé: pH 6,4, par exemple, pour le plasma de lapin et de mouton. L'interférence du pH optimal, différant d'une espèce à l'autre, est une notion récente (I969) qui n'a pas été prise en considération par les auteurs antérieurs. Ainsi GARTTINI et coll. (60) ont-ils comparé l'activité oxydase de plusieurs espèces animales selon la technique de RAVIN (42) et celle d'AKERFELDT (6I). Ces auteurs trouvent le plasma humain plus actif que celui de 6 espèces animales, dont le lapin et le cheval, alors que PEISACH et LEVINE (62) trouvèrent la céruloplasmine de porc plus active que celle de l'homme. VAN DEN HAMER et coll.(63) ne trouvent pratiquement pas de différence entre l'homme, le porc, et le mouton. Notons que de nombreux travaux ont, d'une part souligné l'effet inhibiteur de certains anions sur l'activité oxydasique de la céruloplasmine, et d'autre part, dégagé l'effet activateur de certains métaux, L'interférence de ces facteurs n'a pas été prise enconsidération par les auteurs ayant fait une étude comparative de l'activité oxydasique des diverses espèces animales.

Il est difficile d'évaluer l'amplitude exacte des différences d'activité que nous avons observées, en raison de l'influence de la conservation sur l'intégrité moléculaire de la céruloplasmine et plus particulièrement le rapport $E^{I\%}_{Icm}$ à 6I0 mμ / $E^{I\%}_{Icm}$ à 280mμ très élevé: 0,072 alors que le pourcentage de cuivre de cette protéine n'était que de 0,I6 à 0,20 %.

La nature du site chromophore a fait l'objet de nombreux travaux. On rapproche, en général, les céruloplasmines animales des laccases végétales. Ces enzymes (dont le premier a été isolé de Rhus vernicifera

teneur en cuivre. Les deux mesures ne donnent pas toujours des résultats parallèles. Le fait n'a rien d'étonnant, car on apprécie, à 6I0 mμ, la part du cuivre chromophore;celui qui se trouve, non seulement à l'état Cu2+, mais encore inséré d'une façon particulière dans la structure moléculaire. Ainsi STARCHER et coll.(29) ont-ils trouvé pour la céruloplasmine de poulet un rapport $E^{I\%}_{Icm}$ à 6I0 mμ/$E^{I\%}_{Icm}$ à 280mμ très élevé:0,072 alors que le pourcentage de cuivre de cette protéine n'était que de 0,I6 à 0,20%.

La nature du site chromophore a fait l'objet de nombreux travaux. On rapporche en général,les céruloplasmines animales des laccases végétales. Ces enzymes (dont le premier a ét é isolé de Rhus vernicifera appelé "lacquer tree" en anglais) ont la même couleur bleue intense que la céruloplasmine et contiennent du Cu^{+} et du Cu^{2+}.

Pour le céruloplasmine humaine, on a longtemps avancé le chiffre de 8 atomes de cuivre (pour un poids moléculaire de I50 000 à I60 000 selon les auteurs), dont 4 seraient à l'état cuivrique et 4 à l'état cuivreux. Seuls les premiers seraient chromophores et participeraient au transport d'électrons. Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant la disposition dans l'espace de ces 8 atomes de cuivre (BLUMBERG;64 - CURZON; 65), l'interaction possible entre Cu^{+} et Cu^{2+}, leur disposition en paires et la différence qualitative éventuelle entre les deux paires de Cu^{2+} participant à la configuration du site chromophore (VAN GELDER;66-KASPER;67) en I968.

Certaines de ces conclusions se trouvent actuellement remises en question car le taux de cuivre de la céruloplasmine humaine est, en fait, plus faible qu'on ne le pensait. Ainsi MORELL et coll(68) n'ont trouvé qu'un pourcentage de 0,275% de cuivre dans la céruloplasmine humaine obtenue sous forme de grands cristaux tétragonaux. La céruloplasmine humaine n'aurait, d'après les

dernières évaluations, que 6 atomes de cuivre pour un poids moléculaire de I32 000 (MAGDOFF- FAIRCHILD; 69). De tous ces travaux, on ne peut donc retenir que le fait qu'une partie seulement des atomes de cuivre participent à la structure du site chromophore et que ces atomes se trouvent à l'état cuivrique . Ce cuivre est nécessaire à la stabilité moléculaire de la céruloplasmine (67) et SCHEINBERG (70) considère le rapport d'absorption comme lemeilleur critère pour apprécier l'intégrité moléculaire de la céruloplasmine.

Nos résultats montrent, pour le rapport d'absorption $E^{I\%}_{Icm}$ à 6I0 mμ/ $E^{I\%}_{Icm}$ à 280 mμ , que c'est le cheval qui atteint le chiffre le plus élevé; viennent ensuite l'homme et le lapin. Mais, pour la teneur totale en cuivre c'est la céruloplasmine humaine qui s'est révélée la plus riche et les chiffres les plus proches concernent le cheval. et la brebis.

Le "finger printing" ou électrochromatographie des peptides,des différentes céruloplasmines fournit des éléments intéressants concernant les différences de strctures des céruloplasmines de différentes espèces. Cependant le nombre des peptides obtenus à partir de cette molécule, de masse molaire environ I50 000, est important et l'intérprétation des résultats, de ce fait, parfois difficile. Nous avons obtenu 5I peptides pour notre céruloplasmine humaine alors que le nombre de peptides tryptiques obtenus pour une céruloplasmine réduite et amino-éthylée serait de 50 à 55, d'après SIMONS et BEARN (7I).POILLON et coll (72) et SIMMONS et coll (7I) ont récemment pu isoler deux chaines α et β (une certaine hétérogénéité a été observée à l'intérieur de la variété β), à

de la céruloplasmine humaine. Le poids moléculaire de β la première serait d'environ I6 000 et celui de la chaine d'environ 60 000. En admettant qu'une structure analogue existe dans les céruloplasmines animales, on pourrait sans doute obtenir des résultats plus facile à interpréter si les chaine α et β isolées des différentes espèces étaient soumises au finger printing.

Cependant, nous ne pensons pas que les différences observée soient dues à une médiocre reproductibilité de la technique proprement dite. En effet nous avons recommencé le "finger printing", avec des colorations annexes de la céruloplasmine humaine, de nombreuses fois avec des résultats parfaitement reproductibles. Notons qu'une séparation convenable des peptides de celle-ci n'a été obtenue qu'après oxydation préalable des pont di-sulfures(73), traitement très supérieur à la dénaturation préalable par chauffage à 95°C. Toutefois le manque apparent de sensibilité des peptides contenant du trytophane est certainement imputable à l'oxydation des ponts di sulfure par l'acide performique. De tous les acides aminés; seul le trytophane est attaqué par l'acide performique et la mise en évidences des peptides contenant du trytophane compromise dans ces conditions.(74)

La proportion de glucides de la céruloplasmine a été relativement peu étudiée,même en ce qui concerne l a céruloplasmine humaine.JAMIESON(75-76)a fait l'étude la plus complète comportant l'analyse des glycopeptides séparés après digestion de la protéine par la pronase. Nous trouvons un taux d'hexoses de la céruloplasmine humaine qui se situe entre le chiffre obtenu par DEUTSCH et coll (20), soit 4% et celui avancé par SCHULTZE et coll.(77), soit 3%. Le taux trouvé par JAMIESON est de, 4,4% donc légèrement plus élevé.

Pour la teneur en hexosamines, par contre, notre moyenne (3,5%) est très proche du taux trouvé par JAMIESON (3,I%). Or cet auteur obtient un chiffre supérieur à celui de DEUTSCH et coll (2,8%) et à celui de SCHULTZE et coll (I,3%) . Notons, enfin, que notre taux d'acides sialiques (2,9%) est supérieur à celui de SCHULTZE(2%) qui, de son côté, obtient le double du taux de JAMIESON.

et de DEUTSCH.

Au sujet des ceruloplasmines animales, nou s n'avons trouvé , à titre comparatif,que les données de MORELL et coll. (26) concernant la ceruloplasmine de lapin. Or, notre taux d'hexose est le double de celui indiqué par MORELL, alors que la différence concernant les hexosamines est plus faible (3,I % contre 2,3I %).Enfin, nous trouvons moins d'acide sialique (I,5%) que cet auteur (2,I6%). Ces différences, il est vrai, ne sont pas très importantes, rappelons que notre céruloplasmine de lapin contient deux formes, eléctrophorétiquement différentes, dont une disparait lorsqu'on applique le traitement par le mélange alcool-chloroforme utilisé par MORELL et coll.

Nous avons soumis nos ceruloplasmines purifiées à l'immunoélectrophorèse. Les arcs correspondant à celles-ci ont été révélées chez le cheval, le mulet, la brebis, le babouin, alors que le résultat était négatif avec les anti-sérums du commerce anti-lapin et anti-chèvre. Des essais de préparation anti-sérum anti-chèvre chez le lapin, et anti-lapin chez le cobaye ne nous ont pas donné de meilleurs résultats. Les arcs de ceruloplasmine révélés par les anti-serums correspondants ont non seulement été colorés par l'amido-scwarze mais caractérisés aussi par la réaction spécifique à l'aide de la para-phénylène-diamine. Signalons toutefois, que l'arc de la céruloplasmine de cheval n'était pas coloré dans ces conditions, alors que la même préparation était révélée dans les mêmes conditions après électrophorèse;en gel d'amidon.

Un anti sérum de lapin anti-céruloplasmine humaine réagit bien avec la céruloplasmine de babouin. Mais les autres céruloplasmines (excepté naturellement celle de lapin) donnent un complexe antigène anticorps précipitant, en double diffusion si l'on utilise les gamma-globulines de ce même antisérum concentré 5 fois par rapport au sérum de départ. Ceci montre que ces différentes céruloplasmines possèdent certains motifs antigéniques communs.

En ce qui concerne les N-terminaux, nous avons choisi la technique de SANGER et nous avons trouvé, pour la céruloplasmine humaine la valine et la lysine, conformément aux résultats publiés par KASPER et DEUTSCH(38) et par SIMONS et BEARN (7I). Cependant SCHULTZE et coll. (58) avaient signalé 3 N-terminaux, valine, acide aspartique, serine. Notons que l'un des ces auteurs (SCHULTZE) reprend les données de KASPER et DEUTSCH publiés quelques années plus tard (78).

Les résultats obtenus chez le cheval et le babouin n'ont pu être confrontés avec les données de la littérature car seule la céruloplasmine de porc a été étudiée par différents groupes de chercheurs japonais. Dans un cas, on indique la phénylalanine comme unique N-terminal (79) dans un autre cas deux résidus de tyrosine (80).

Malheureusement nous n'avons pu appliquer cette technique aux autres préparations, nous ne disposions plus de matière première en quantité suffisante.

CONCLUSIONS

La technique d'isolement que nous venons de décrire apparait comme une méthode rapide, ce qui est primordial dans le cas d'une protéine aussi labile que la ceruloplasmine. L'étude de quelques critères de pureté montre que nous obtenons, par ce procédé une céruloplasmine dont les caractéres révèlent un produit convenablement purifié.

Cette technique ne comporte ni pH extrèmes, ni l'emploi de solvant organique dans des conditions préjudiciables à l'intégrité moléculaire des protéines étudiées. Ce fait nous parait particulièrement important car l'emploi du mélange classique alcool-chloroforme aboutit, dans la cas de la céruloplasmine de lapin, par exemple, à l'élimination élective d'une fraction de la céruloplamsine . L'existence naturelle d'une variété " Apoceruloplasmin like" , pauvre en cuivre, dans le plasma humain est désormais prouvée; et elle indique que des variantes analogues peuvent exister chez l'animal. Il est donc important de ne pas les éliminer pas dénaturation sélective.

Nos résultats fournissent donc un point de départ pour une étude précise de la céruloplasmine, en particulier pour une comparaison de la structure des bandes révélées par migration électrophorétique dans plusieurs ceruloplasmines animales, étude dont on pourrait espérer peut-être un enseignement relatif au mécanisme de fixation du cuivre par la céruloplasmine.

BIBLIOGRAPHIE

I-HOLMBERG,C.G, LAURELL C.B
Acta Chem.Scand. I948,2, 550

2-NAKAMURA,T.
Biochim.Biophys.Acta I958,30;44

3-OMURA,T.
J.Biochem.I96I,50; 264

4- LAURELL,C.B.
in F.W.PUTNAM"The Plasma Protéins"Vol,I,
Academic Press, New-York, I960,page 360.

5-SCHEINBERG,I.H.
in PEISACH,J.,AISEN,P.,BLUMBERG,W.E.
" The biochemistry of copper",Academic Press,
New-York, I966,page 5I3

6-SCHEINBERG,I.H.,STEINLIEB,I.
Pharmacological Reviews,I960,I2, N°3,355

7- MORELL,A.G.,AISEN,P., SCHEINBERG,H.I.
J.Biol.Chem. I962,237,N° II,3455

8- SGOURIS,J.T.,COREYELL,F.C,GALLICK,H.
STOREY,R.W.,MAC CALL,K.B., ANDERSON;H.D.
Vox sang, I962,7,394

9- SKVARIL,F.,HOBZOVA,J.,KALOUS,V., SIGMUNDOVA,V
Collection Czechoslov,Chem.Commun.I965,30, I7I3

I0- BJORLING,H.
Vox sang I963,8, 64I

II- CURZON,G, VALLET,L.
Biochem.Journal, I960,74, 279

I2- KEKWICK,R.A.,MACKAY,M.E.
Spec.Rep.Ser.Med.res.Coun.Lond,I954, N° 286

I3- BROMAN,L.
Nature I958,I82, I655

I4- BROMAN,L.,KJELLIN,K.
Biochim.Biophys. Acta. I964,82; I0I

I5- RICHTERICH,R., TEMPERLI,A., AERI,H.
Biochim, Biophys.Acta. I962,56; 240

I6- DEUTSCH,H.F.
Arch. Biochem.Biophys.I960,89,225

I7-BOCK,R.M.,LING,N.S.
Anal.Chem, I954,26, I543

I8-DEUTSCH,H.F., FISHER,G.B.
J. Biol.Chem. I964,239, n° I0, 3325

I9- SANDERS,B.E.,MILLER,O.P.,RICHARD, M.N.
Arch.Biochem.Biophys. I959.84 , 60

20- DEUTSCH,H.F.,KASPER,C.B.,WALSH,D.A.
Arch.Biochem.Biophys. I962, 99, N° I. I32

2I- STOKES, B.P.
Clin.Chim.Acta. I967,I5, 5I7

22- STEINBUCH,M.,QUENTIN,M.
Nature. I959, I83, 323

23-OSAKI,S.
Biochem. J. I960,48; n° 2,I90

24- OSAKI,S.,KAYA,T.,KANAZAWA,T.,OGIWARA,S.
SATO,T., SHIMIZU,M.
Proc.Japan Acad. I96I,37, 54

25- LEVINE, W.G., PEISACH,J.
Biochim. Biophys.Acta. I963,77, 603

26- MORELL,A.G., IRVINE, B.A., STERNLIEB,I.
SCHEINBERG,I.H.
J. Biol. Chem. I968,243, n° I, I55

27- BINETTE,J.P., MAC NAIR, M.B., CALKINS,E.
Biochem.J. I965 , 94, I43

28- SHAPOSHNIKOV,A.M., MUKHA,G.V.
Biokhimiya. I967,32, n° 5, 908

29- STARCHER,B., HILL, C.H.
Biochim. Biophys.Acta.. I966, I27, 400

30- INABA,T. ,FRIEDEN,E.
J. Biol. Chem. I967, 242, n° 20, 4789..

31- CARRICO,R.J., DEUTSCH,H.F., BEINERT,H.
ORME-JOHNSON,W.H.
J. Biol. Chem. 1969 , N° 15, 4141 , 244

32- KLINE,D.L
J. Biol. Chem. 1953,204; 949

33- CHANUTIN,A., CURNISH,R.R.
ARch. Biochem. Biophys. 1960,89, 218

34- AUDRAN,R., STEINBUCH,M.
Proc, 10th Cong.Europ. Soc. Haemat. Strasbourg
1967,Part II, 922

35- STEINBUCH,M. AUDRAN,R.
Arch. Biochem. Biophys. 1969,134, 2 , 279

36- SCHEINBERG,I.H., COOK,C.D. , MURPHY,J.A.
J. Clin. Invest. 1954,33, 963

37- BURSTEIN,M.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. 1967, XII,68

38- KASPER,C.B., DEUTSCH,H.F.
J. Biol. Chem. 1963, 238, N° 7, 2325

39- MOURAY,H.- MORETTI,J.- FINE,J.M.
Bull. Soc. Chim. Biol . 1961, 43, N°7,993

40- SMITHIES,O.
Biochem.J. 1955, 61, 629

41- GRABAR,P.- BURTIN,P.
"Analyses immunoélectrophorétique; ses applications aux liquides biologiques humains"- MASSON, PARIS- 1960.

42- RAVIN, H.A.
Lancet, 1956,I, 726

43- HENRY, CHIAMORI, JACOBS, SEGALOVE
Clinical Chemistry Principles and Technics

44- BINGLEY,J. , DICK,A.T.
Clin. Chim. Acta, 1969,25, 480

45- SCHEINBERG,I.H., MORELL,A.
J. Clin. Invest. 1957 ,36, 1193

46- BEALE,R.N., CROFT,D.
J; Clin . Path. 1964, 17,260

47- INGRAM,V.M.
Biochim, Biophys.Acta. I959,28, 539

48- EASLEY,C.
Biochim. Biophys. Acta. I965, I07, 386

49- DREYWOOD,R.
Ind. Eng. Chem.Anal.Ed. I946, I8, 499

50- SCOTT,T.A., MELVINE,H.
Anal.Chem. I953,25, I656

5I- ELSON, L.A., MORGAN, W.T.J.
Biochem, J; I933, 27, I824

52- WARREN,L.
J. Bilo. Chem. I959, 234, I97I.

53- SANGER,F.
Biochem.J. I945,39, 507

54- PORTER,R.R., SANGER,F.
Biochem.J., I948,42, 287.

55-GROS,C., LABOUESSE,B.
Europeén J. Biochem. I969, 7, 463

56 - JOHNSON,W.C.
"Organic reagents for metals" - Hopkin & Williams-
Ltd. Chadwell Heath- Vol I- I955, P; 66

57- HEIMBURGER,N., HEIDE,K., HAUPT,H, SCHULTZE,H.E.
Clin. Chim. Acta. I964, I0, 293.

58- SCHULTZE,H.E., MALHING , A.
Bibliotheca Hematol I96I, I2, I97.

59- SHREFFLER,D.C., BREWER,G.J., GALL,J.C.
HONEYMAN, M.S.
Biochem. Genet. I967,I, I0I

60- GARATTINI,S., GIACHETTI,A, PIERI,L.
Arch Biochem. Biophys. I960,9I, N°I, 83

6I- AKERFELDT,S.
Science, I957 , I25, II7

62- PEISACH,J., LEVINE, W.G.
J; Biol. Chem. I965, 240, N° 6, 2284

63- VAN DEN HAMER, C.J.A., BUYZE,G., VAN DER HEYDEN,M.C.
In Peeters H. " Protides of the biological fluids"
Proceeding of the I2th Colloquium- Bruges, I965
Elsevier Publ.Comp. Amsterdam, P. 382

64- BLUMBERG,W.E., EISINGER, J.,AISEN,P., MORELL,A.G.
SCHEINBERG,I.H.
J. Biol.Chem. I963,238, I675

65- CURZON,G., CUMINGS,J.N.
In PEISACH, J.,AISEN,P., BLUMBERG,W.E.
" The Biochemistry of copper"Acad. Press.
New-York, I966, part 6, p. 545.

66- VAN GELDER, B.F., VELDSEMA, A.
Biochim Biophys. Acta, I966, I30, 267

67- KASPER,C.B.
J. biol. Chem. I968, 243, n° I2, 32I8

68- MORELL, A.G., VAN DEN HAMER C.J.A., SCHEINBERG,I.H.
J. Biol. Chem I969, 244, n° I3, 3494

69- MAGDOFF- FAIRCHILD, B., LOVELL, F.M.,LOW,B.W.
J. Biol Chem. I969, 244 ,n° I3, 3497

70- SCHEINBERG, I.H.
In PEISACH ,J.- AISEN,P., BLUMBERG, W.E.
" The Biochemistry of copper " acad Press
New York, I966, Part 6 , P. 5I3

7I- SIMONS,K., BEARN, A.G.
Biochim. Biophys. Acta, I969, I75, 260

72- POILLON, W.N., BEARN, A.G.
Biochem. Biophys. Acta, I967, I27, 407

73- HIRS,C.H.W.
J. Biol Chem. I956, 2I9, 6II

74- SCHROEDER,W.A.
" The primary structure of protéins". Harper & Row
New-York, I968, Chap 9 , P. 93

75 - JAMIESON, G.A.
In Peeters, H. " Protides of the biological fluids "
Proceeding of the I2th Colloquium Bruges
Elsevier Publ. Comp. Amsterdam I965, P. 379

76 - JAMIESON, G.A.
J. Biol Chem. I965, 240,5, 20I9

77- SCHULTZE, H.E., GOLLNER,I., HEIDE,K.
SCHONENBERGER, M; SCHWICK,G.
Naturforsch, I955, 10 b, 463.

78- SCHULTZE,H.E.,HEREMANS, J.F.
" Molecular Biology of human protéins"
Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, I966, Vol I - p. 202

79- KAYA,T., OSAKI,S., SATO, T.
J. Biochem, I96I,50, N° I, 24

80 -MUSAKA,H., KAJIYAMA,S., SUGIYAMA,K.
FUNAKUBO,K., ITOH,M., NOSOH,Y, SATO,T.
Biochim, Biophys, Acta, I968, I68, I32.

TABLE DES MATIERES

- Introduction I à4

- Chapitre I : Historique
  Techniques d'isolement de la céruloplasmine humaine 5 à I5
  Techniques d'isolement de quelques céruloplasmines animales I6 àI8

- Chapitre II : Nouvelle technique d'isolement de la céruloplasmine
  Céruloplasmine humaine 24 à 28
  Céruloplasmine animale 29 à 48.

- CHapitre III : Etude physico-chimique
  Principe des méthodes employées 49 à 64
  Résultats 65 à 96

- Chapitre IV : Discussion 97 à I05

- Conclusion : I06- I07

- Bibliographie: I08 à II3